

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. J.-C. Tonn

**Untersuchungen zur Porphyrin-Akkumulation im perifokalen  
Gliomgewebe und normalen Hirngewebe nach Gabe von  
5-Aminolävulinsäure**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Walter Rachinger

aus

Pappenheim

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. W. Stummer

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. N. Plesnila

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. J. Herms

Prof. Dr. med. B. Przybilla

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2006

1	Einführung.....	6
1.1	Klinische Aspekte .....	6
1.2	5-Aminolävulinsäure - induzierte Protoporphyrin IX - Fluoreszenz zur intraoperativen Tumordemarkierung.....	7
1.3	Zielsetzung dieser Untersuchung .....	12
2	Material und Methoden .....	15
2.1	Versuchstiere und Haltung .....	15
2.1.1	Versuchsgruppen .....	15
2.2	Eingriffe an den Versuchstieren.....	17
2.2.1	Narkose .....	17
2.2.2	Zellkultur .....	17
2.2.3	Inokulation der C6-Zellen.....	19
2.2.4	Medikamentenapplikation .....	20
2.2.5	Applikation der Aminolävulinsäure.....	21
2.2.6	Gehirnentnahme .....	22
2.3	Histologie.....	22
2.4	Makroskopische Bildbetrachtung.....	23
2.5	Mikroskopische Fluoreszenzmessung.....	25
2.5.1	Aufbau .....	25
2.5.2	Bilddokumentation .....	25
2.5.3	Spektroskopie.....	26
2.6	Statistische Methoden .....	29

3	Ergebnisse .....	30
3.1	Dosisabhängigkeit von 5-Aminolävulinsäure nach intravenöser Applikation .....	30
3.2	Einfluss von Kortikosteroiden .....	35
3.3	Applikation von 5-Aminolävulinsäure-ester-derivaten.....	38
3.4	Intratumorale Applikation von 5-Aminolävulinsäure.....	44
3.5	Interstitielle Applikation von 5-Aminolävulinsäure ins Normalgewebe .....	47
3.6	Fluoreszenzintensität im Ödem .....	49
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	50
4	Diskussion.....	51
4.1	Grundlagen.....	51
4.1.1	Pathogenese des Hirnödems .....	53
4.1.2	Hirnödem und Glukokortikoide .....	54
4.1.3	5-Aminolävulinsäure und die Blut-Hirn-Schranke .....	55
4.2	Eignung des C6 Gliommodells für die vorliegende Untersuchung.....	56
4.3	Diskussion der Ergebnisse .....	59
4.3.1	Dosisabhängigkeit von 5-Aminolävulinsäure .....	59
4.3.2	Unspezifische Fluoreszenz im ödematösen Hirngewebe .....	60
4.3.3	Einfluss von Glukokortikoiden.....	61
4.3.4	5-Aminolävulinsäure-ester-derivate .....	62
4.3.5	Interstitielle und intratumorale Applikation .....	63

4.4	Integration der Ergebnisse in ein Gesamtmodell - Analyse in Hinblick auf die Anwendung von 5-Aminolävulinsäure bei ZNS-Tumoren des Menschen .....	64
5	Zusammenfassung .....	67
6	Literatur .....	69
7	Danksagung .....	82
8	Lebenslauf .....	83

# 1 Einführung

## 1.1 Klinische Aspekte

Gliome sind die häufigsten Tumore des zentralen Nervensystems. Sie leiten sich von der Neuroglia, dem Stützgewebe des zentralen Nervensystems, ab und werden nach der World Health Organisation (WHO) entsprechend ihrer Dignität in 4 Grade eingeteilt. Zu den „malignen“ Formen zählen das anaplastische Astrozytom (WHO III<sup>o</sup>) und das Glioblastoma multiforme (WHO IV<sup>o</sup>; Riede et al. 1995)

Die derzeitige Standardtherapie besteht aus Operation, Bestrahlung und in geeigneten Fällen auch Chemotherapie (Goetz et al. 1999). Dennoch beträgt die mittlere Überlebenszeit für anaplastische Astrozytome nur 3,1 Jahre, für Glioblastome lediglich 1,1 Jahre. Die Radikalität der am Anfang stehenden Operation scheint dabei einen entscheidenden Einfluß auf die Prognose zu haben (Albert et al. 1994, Ammirati et al. 1987, Barker et al. 1996, Devaux et al. 1993, Keles et al. 1999, Nitta et al. 1995, Rostomily et al. 1994, Simpson et al. 1993, Winger et al. 1989, Wisoff et al. 1998, Wood et al. 1988, Yoshida et al. 1994). Die Entfernung des gesamten kontrastmittelaufnehmenden Tumors ist schwierig, da intraoperativ die Unterscheidung zwischen randständigen, solide proliferierenden und infiltrierenden Tumorgewebe und funktionstragenden Normalgewebe selten mit der ausreichenden Sicherheit möglich ist. Eine großzügige Resektion birgt in unsicheren Fällen die Gefahr zusätzlicher neurologischer Störungen (Kelly et al. 1997). Bei einer Therapie, die aufgrund der absehbaren Rezidivierung im Wesentlichen palliativen Charakter hat, ist es oberstes Gebot, eine schwerwiegende neurologische Störung zu vermeiden (Wood et al. 1988, Vecht et al. 1990, Albert et al. 1994, Kowalczyk et al. 1997).

Aufgrund dieser Problematik wurden in der Vergangenheit verschiedenste Techniken untersucht, unter anderem die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, um Tumorgewebe sicherer abgrenzen zu können (Moore et al. 1948, Poon et al. 1992, Kabuto et al. 1997).

Grundlage dieser Versuche war die scheinbare Eigenschaft mancher Fluorochrome wie Porphyrine, sich in Gewebe maligner Gliome selektiv anzureichern. Es musste jedoch davon ausgegangen werden, dass die scheinbare Anreicherung direkt auf die in malignen Gliomen vorliegende Störung der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen war (Stummer et al 1993). Die Spezifität der Anfärbung war entsprechend eingeschränkt. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen mit exogen verabreichten Fluorochromen, bietet eine seit kurzem für die Fragestellung der Tumormarkierung eingesetzte Substanz, die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), eine vielversprechende Alternative.

## **1.2 5-Aminolävulinsäure - induzierte Protoporphyrin IX - Fluoreszenz zur intraoperativen Tumordemarkierung**

5-ALA ist ein Metabolit der Hämbiosynthese und wird mit Hilfe der 5-ALA-Synthase aus Succinyl-CoA, einem Zwischenprodukt des Zitratzyklus, und der Aminosäure Glycin gebildet (siehe Abb. 1). Im Rahmen dieses Syntheseweges wird ein Porphyrinring ausgebildet, wobei im vorletzten Schritt das nach Anregung mit violett-blauen Licht stark rot-fluoreszierende, lipophile Protoporphyrin IX (PPIX) entsteht. Die zentrale Positionierung des  $\text{Fe}^{2+}$ -Atoms in PPIX erfolgt durch die mitochondriale Ferrochelatase und schließt die Hämbiosynthese ab. Das am Ende der

Stoffwechselkette entstehende Hämmolekül hemmt durch eine negative Rückkopplung die endogenen Synthese von 5-ALA.

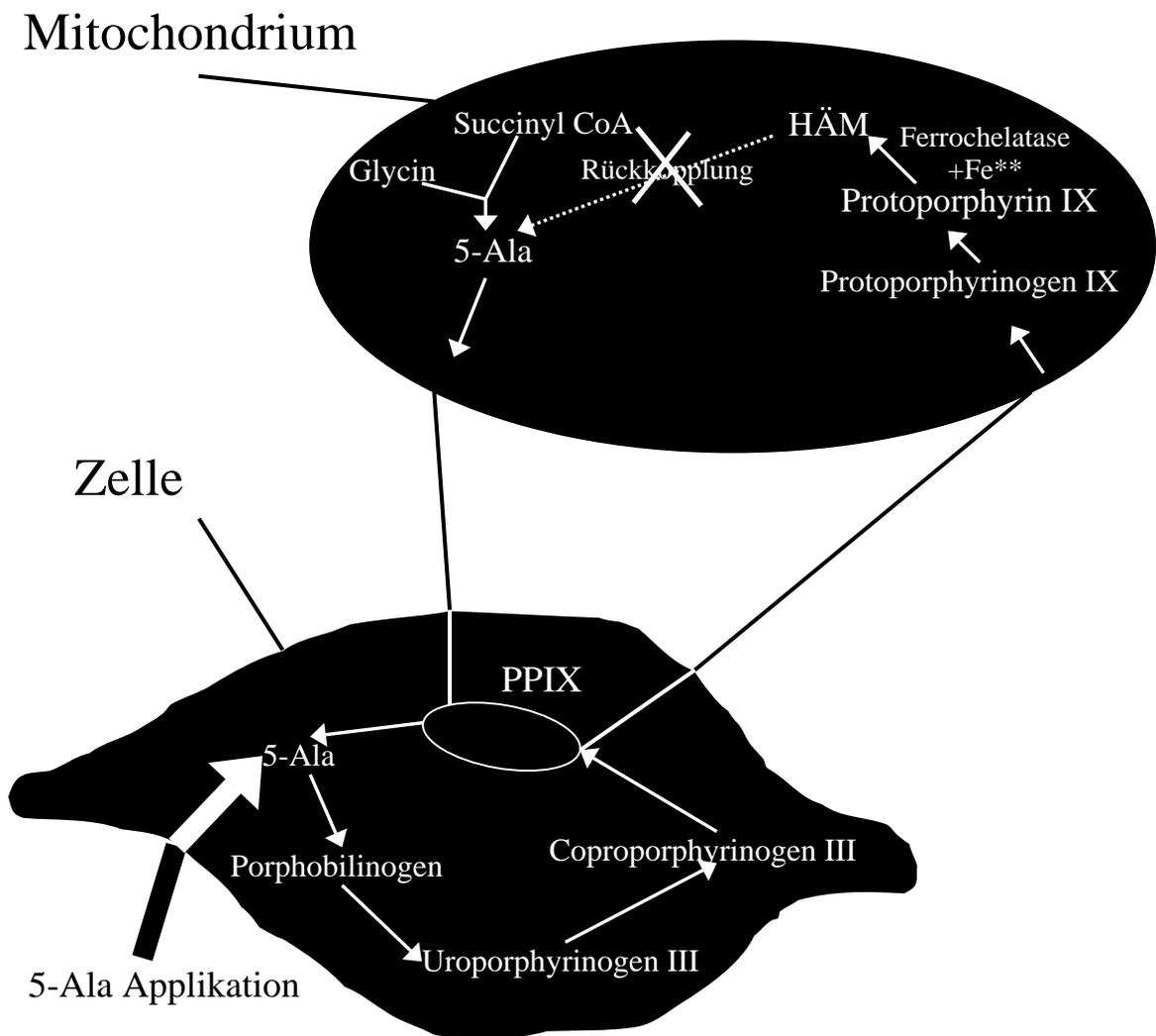
Da die meisten kernhaltigen Zellen für die oxydative Phosphorylierung im Rahmen ihres Stoffwechsels hämhaltige Enzyme zum Elektronentransport verwenden, wird davon ausgegangen, dass alle diese Zellen eine gewisse Kapazität zur Produktion von PPIX besitzen (Kennedy et al. 1992).

Durch exogene Zufuhr von hohen 5-ALA-Konzentrationen kann nun die Hemmung dieses Stoffwechselweges durch Häm umgangen werden und eine erhöhte Produktion von PPIX induziert werden (Kennedy et al. 1992). Da die Weitermetabolisierung von PPIX zu Häm durch die begrenzte Aktivität der Ferrochelatase den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt darstellt, tritt eine Akkumulation von PPIX ein (Peng et al. 1997).

PPIX ist durch seine Fähigkeit zur intensiven Fluoreszenz gekennzeichnet. Das Absorptionsmaximum liegt dabei bei 400 nm. Die Fluoreszenzemission findet sich im roten Spektralbereich (Emissionsmaxima bei 635 nm und 700 nm).

**Abbildung 1:**

Hämbiosynthese : 5-ALA wird aus Succinyl-CoA und Glycin gebildet. Über die Zwischenmetabolite Porphobilinogen, Uroporphyrinogen III und Protoporphyrinogen IX entsteht im Mitochondrium Protoporphyrin IX, das durch das Enzym Ferrochelatase zu Häm weiterverstoffwechselt wird. Häm hemmt durch negative Rückkopplung die endogene 5-ALA-Produktion. Durch exogene Zufuhr von 5-ALA wird diese Synthesehemmung umgangen. Durch eine begrenzte Aktivität der Ferrochelatase kommt es zu einer verstärkten Synthese und Akkumulation von Protoporphyrin IX.

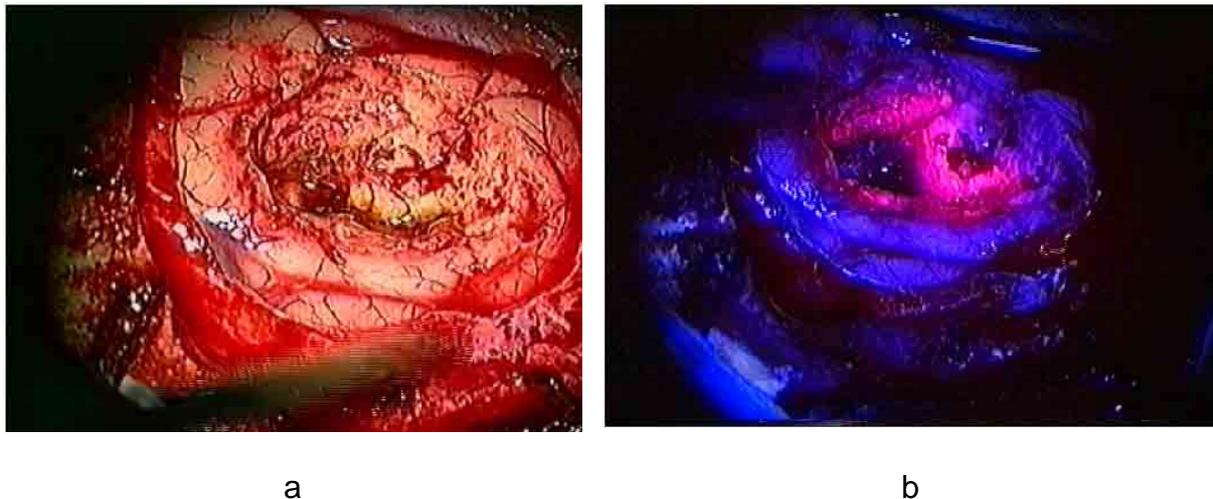


Eine verstärkte Synthese und Akkumulation von PPIX nach exogener Zufuhr von 5-ALA wurde in vielen nicht-neoplastischen Geweben beobachtet, vor allem in Geweben epithelialen Ursprungs. Eine bevorzugte Anreicherung konnte allerdings auch in Tumoren unterschiedlicher Herkunft beobachtet werden, z.B. bei gastrointestinalen, urologischen, dermatologischen oder Tumoren im Hals-Nasen-Ohren-Bereich (Fritsch et al. 1996, Grant et al. 1993, Kennedy et al. 1992, Kriegmair et al. 1996, Loh et al. 1993, Regula et al. 1995).

Eine besonders deutliche PPIX-Akkumulation konnte bei malignen Gliomen nach 5-ALA-Verabreichung nachgewiesen werden. Diese Akkumulation war hochspezifisch und trat in normalem Hirngewebe nicht auf (Stummer et al. 1998, 2000). Die sich hieraus ergebende, ausgezeichnete Kontrastierung von malignen Gliomgewebe konnte intraoperativ genutzt werden um malignes Gliomgewebe abzugrenzen und vollständiger zu entfernen (Abb. 2, Stummer et al. 1998). Aufgrund der vielversprechenden klinischen Ergebnisse wird derzeit eine prospektiv randomisierte Multizenterstudie durchgeführt, bei der das Verfahren der fluoreszenzgestützten Resektion mit 5-ALA mit dem konventionellen Verfahren der Mikrochirurgie verglichen wird. Erste Ergebnisse dieser Untersuchung sind voraussichtlich im Herbst 2004 zu erwarten.

**Abbildung 2:**

Vergleich der Darstellung einer Resektion eines malignen Glioms im Operationsmikroskop unter Weißlicht (a) und unter Fluoreszenzanregung (b). Die Abbildung zeigt den eröffneten Kortex mit darunterliegendem, malignen Gliom, erkennbar an der bräunlichen, zentralen Nekrose. Unter Weißlicht lässt sich der randständige Tumor kaum abgrenzen. Unter blau-violetter Beleuchtung zeigt der randständige Tumor eine deutliche Rotfluoreszenz, während die Nekrose keine Fluoreszenzakkumulation erkennen lässt. Dies belegt den metabolischen Charakter der beobachteten Fluoreszenzakkumulation. Das normale Hirngewebe zeigt keine Fluoreszenzakkumulation.



Bislang konnten die Mechanismen der selektiven Akkumulation von PPIX im malignen Gewebe abschließend geklärt werden. Eine angeführte Ursache ist die im Vergleich zum Normalgewebe verringerte Aktivität der Ferrochelatase, welche zu einer verstärkten PPIX-Anreicherung im Tumor führen kann (Dailey et al. 1984, del C. Battle 1993, Schoenfeld et al. 1987, van Hillegersberg et al. 1992, Inuma et al. 1994, El-Sharabasy et al. 1992).

Als weitere Möglichkeit wird eine erhöhte 5-ALA-Aufnahme durch eine erhöhte Membranpermeabilität im Bereich der neoplastischen Gewebe diskutiert (Kennedy et al. 1990, Peng et al. 1997, Ackerman et al. 1998). Möglicherweise trägt ein im

malignen Gewebe erhöhter Stoffwechsel aufgrund der proliferativen Aktivität im Tumorgewebe zur vermehrten Umsetzung von 5-ALA bei (Inuma et al. 1994)

### **1.3 Zielsetzung dieser Untersuchung**

Obwohl die fluoreszenzgestützte Resektion maligner Gliome mit 5-ALA bereits auf breiter Basis klinisch eingesetzt wird, konnten auch bei dieser Tumorentität die Ursachen der selektiven PPIX-Akkumulation bislang nicht geklärt werden. Neben metabolischen Gründen ist im zentralen Nervensystem zusätzlich ein Einfluss durch die Blut-Hirn-Schranke zu erwarten. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) regelt das milieu interieur des Extrazellulärraums und schränkt den freien Übertritt von Plasmabestandteilen deutlich ein.

5-ALA ist eine polare Aminosäure, und es hat sich zeigen lassen, dass 5-ALA die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht passiert (Garcia et al. 1998, Terr et al. 1983, Novotny et al. 2003). Anders verhält es sich im Bereich von malignen Hirntumoren. Diese werden durch pathologische Gefäße versorgt, deren Schrankeneigenschaften deutlich gestört sind, und deren Architektur und Ultrastruktur sich deutlich von normalen Hirngefäßen unterscheidet (Stewart et al. 1994).

Ob und zu welchem Ausmaß die gestörte Blut-Hirn-Schranke an dem Phänomen der selektiven Akkumulation von fluoreszierenden Porphyrinen im malignen Gliom beteiligt ist, wurde bislang nicht systematisch untersucht.

Es war daher Ziel der vorliegenden Arbeit die Rolle der Blut-Hirn-Schranke näher zu charakterisieren. Hierzu wurden verschiedene Ansätze gewählt:

1. Die Fluoreszenzausbeute sollte sowohl von der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, von der Permeabilität der Zellmembranen als auch vom Zellmetabolismus abhängen. Durch Erhöhung der 5-ALA-Dosis sollte sich prüfen lassen, ob die Fluoreszenzausbeute durch die am Patienten eingesetzte Dosis von 20 mg/kg bereits seine Grenzen erreicht, oder ob sich durch eine Steigerung der Dosis eine höhere Fluoreszenzausbeute erzielen lässt, weil die beteiligten Systeme bei der niedrigen Dosierung noch nicht gesättigt sind.
2. Kortikosteroide führen bei malignen Gliomen zur Reduktion des tumorinduzierten Hirnödems durch Abdichtung der Blut-Hirn-Schranke (Eisenberg et al. 1970, Samdani et al. 1997). Wäre die gesteigerte Permeabilität an den neoplastischen Gefäße wesentliche Bedingung für die Akkumulation von Porphyrinen im malignen Gliomen, sollte sich diese Akkumulation durch Gabe von Steroiden verringern lassen.
3. Falls entweder die Blut-Hirn-Schranke oder die Tumorzellmembranen signifikante Barrieren für die Umsetzung von 5-ALA zu fluoreszierenden Porphyrinen darstellen, sollte die Umgehung dieser Barrieren durch intravasaler Verabreichung lipophiler Derivate des 5-ALA, z.B. von ALA-Estern, zu einer gesteigerten Fluoreszenzausbeute führen.
4. Falls der Blut-Hirn-Schranke die entscheidende Rolle für die Aufnahme und selektive Umsetzung von 5-ALA zukommt, sollte sich durch interstitielle Infusion von 5-ALA eine gesteigerte Umsetzung erzielen lassen, sofern die Aufnahme der Tumorzellmembranen nicht das Ausmaß der Umsetzung einschränkt.

Betrachtungen dieser Art könnten schon deshalb von großem Interesse sein, da ein Verständnis der Mechanismen genutzt werden könnte, durch Manipulation die Protoporphyrin IX Ausbeute im Tumorgewebe zu verbessern. Ließen sich in weiterführenden Arbeiten spezifische Mechanismen identifizieren, z. B. spezifische 5-ALA-Transporter, könnten diese zudem als Zielpunkt einer anti-neoplastischen Therapie genutzt werden.

## **2 Material und Methoden**

Die Experimente wurden im Laserforschungslabor der Urologischen Klinik im Klinikum Großhadern vorgenommen und erfolgten nach positiver Begutachtung der Protokolle durch die Regierung von Oberbayern.

### **2.1 Versuchstiere und Haltung**

Für die Versuche wurden nur männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 240 und 260 g verwendet. Die Tiere lieferte die Firma Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld. Sie wurden in transparenten Polycarbonatkäfigen Typ 4 (Bodenfläche: 1815 cm<sup>2</sup>, Höhe: 20 cm) der Firma Ehret, Emmendingen, bei 20°C im 12h Hell-/Dunkelrhythmus zu maximal 4 Tieren pro Käfig gehalten. Trinkwasser und Spezialfutter für Ratten und Mäuse (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

#### **2.1.1 Versuchsgruppen**

Folgende Versuchsgruppen wurden im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht. Bei allen Gruppen betrug die Anzahl der Versuchstiere n=6.

1. Zur Ermittlung des Einflusses der Dosis von 5-ALA auf die Fluoreszenzausbeute wurden entweder die klinisch übliche Dosis von 20

mg/kg Körpergewicht oder eine gesteigerte Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht 5-ALA intravenös verabreicht.

2. Zur Ermittlung des Einflusses von Steroiden auf die PPIX – Konzentration wurde einer Gruppe von tumortragenden Tieren mit Dexamethason vorbehandelt. Später bekamen diese Tiere 20 mg/kg Körpergewicht intravenös verabreicht.
3. Um den Einfluß der Lipophilität auf die Fluoreszenzausbeute zu untersuchen wurde einer Gruppe von tumortragenden Tieren mit einem Derivat von 5-ALA, dem 5-ALA–Methylester, einem Ester mit einem niedrigen Oktanol/Wasser-Partitionskoeffizienten behandelt, d.h. mit einer wenig lipophilen Substanz. Einer anderen Versuchsgruppe wurde ein Derivat mit hohem Oktanol/Wasser-Partitionskoeffizienten, dem 5-ALA-hexylester, verabreicht, d.h. mit einer stark lipophilen Substanz.
4. Um zu ermitteln, ob die Blut – Hirn – Schranke eine wesentliche Barriere darstellt und ob Gliomgewebe auch dann spezifisch PPIX anreichert, wenn die Blut – Hirn – Schranke umgangen wird, erhielten tumortragende Tiere stereotaktisch eine intratumorale Instillation 5-ALA.
5. Schließlich erfolgte bei einer Kontrollgruppe ohne C6-Gliom eine interstitielle Infusion von 5-ALA.

## **2.2 Eingriffe an den Versuchstieren**

### **2.2.1 Narkose**

Bei allen Versuchen fand eine Maskennarkose über ein Inhalationsgerät Titus mit Narkosemittelverdunster Isoflurane-Vapor 19.3 (Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck) mit einem Isofluran-/Sauerstoffgemisch Verwendung. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 5 Vol% Isofluran und einer Flussrate von 2 l/min Sauerstoff unter einer über das Versuchstier gestülpten Plastikhaube. Nach Umlagerung der Tiere auf ein Heizkissen wurde eine Maske aufgesetzt, um die Gasnarkose mit Isofluran aufrecht zu erhalten. Bei den so betäubten Tieren wurde nach Desinfektion der Bauchhaut eine intraperitoneale Injektion von 3,6 % Chloralhydratlösung (1,2 ml/100 g Körpergewicht) vorgenommen. Um ein Auskühlen zu vermeiden wurden alle Präparationen auf einer Wärmeplatte vorgenommen. Eine Isoflurankonzentration von 2,5 Vol% bei einer Flussrate von 0,6 l/min Sauerstoff wurde während der chirurgischen Präparation aufrechterhalten.

### **2.2.2 Zellkultur**

Die C6-Zellen wurden vom Institut für Chirurgische Forschung des Klinikums Großhadern, München, zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie geht auf einen glialen Rattentumor zurück, der in vivo durch Injektion von N-Nitroso-N-Methylharnstoff induziert wurde. Es wurden jeweils  $10^6$  Zellen zwischen Passage 68 und 77 in 1 : 10 mit Dimethylsulfoxid versetztem Medium in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Herstellung des Mediums 500 ml Rohmedium mit 50 ml fötalem Kälberserum, 15 ml

Penicillin/Streptomycin/Glutamin und 5 ml Natrium-Pyruvat versetzt. Alle verwendeten Reagenzien wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden mindestens 1 Woche vor Inokulation aufgetaut und in eine mit 20 ml gefüllte Kulturflasche gegeben, und diese in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Nach 24 Stunden wurde das alte Medium abgegossen und 20 ml neues Medium hinzugegeben. Ab dem zweiten Tag musste die Zellkultur täglich gesplittet werden. Beim Splitten wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgewaschen. Danach wurde 1 ml der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche gegeben, beide Kulturflaschen wieder mit 20 ml Medium gefüllt und in den Brutschrank gegeben.

Bei der Inokulation fanden Zellen der Passage 75 bis 90 Verwendung. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml Trypsin/ETDA abtrypsinisiert und die Zellsuspension in ein Röhrchen zu 13 ml Medium gegeben und anschließend der Inhalt des Röhrchens wurde gut vermischt. Es wurden 50 µl entnommen, mit 50 µl Trypanblau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Damit wurde unter einem Mikroskop die Vitalität der Zellen überprüft werden und die Anzahl der Zellen bestimmt. Das Röhrchen wurde in eine Zentrifuge gegeben und 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die so gewonnenen reinen C6-Zellen mit PBS (pH 7,4) verdünnt um eine Zellkonzentration  $2 \times 10^4$  C6-Zellen pro Mikroliter zu erhalten. Jede Ratte wurde mit 5 µl dieser Zellsuspension (=  $10^5$  C6-Zellen) inokuliert.

Tabelle 1 fasst die für die Zellkultur verwendeten Substanzen zusammen.

**Tabelle 1**

Flow	Hera Safe	Heraeus, Hanau
Brutschrank	BB 6220	Heraeus, Hanau
Mikroskop	Axiovert 35	Zeiss, München
Zentrifuge	Megafuge 2.0	Heraeus, Ostrode
Kulturflaschen	Nunclon 80 cm <sup>2</sup>	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
PBS	ph 7,4	Apotheke Innenstadt, München
Rohmedium	Dulbecco's MEM	Seromed®Biochrom KG, Berlin
Fetales Kälberseum (FKS)		Seromed®Biochrom KG, Berlin
Natrium-Pyruvat	100 mM	Seromed®Biochrom KG, Berlin
Penicillin/ Streptomycin/ Glutamin	10000 U/ml 10000 µg/ml 29,2 mg/ml	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Trypsin/EDTA		Gibco BRL, Paisley, Schottland
Trypanblau	0,5%	Serva Feinbiochemica GmbH & Co.KG, Heidelberg
DMSO		Merck, Darmstadt

### 2.2.3 Inokulation der C6-Zellen

Nach Fixierung des Kopfes der narkotisierten Tiere in einem stereotaktischen Halterung wurden die Haare rasiert und desinfiziert. Ein ca. 1,5 cm langer, sagittaler Hautschnitt wurde entlang der Mittellinie angebracht und die Schädeldecke durch Abpräparieren der Galea freigelegt. 3 mm lateral und dorsal des Bregma (Schnittstelle von Koronar- und Sagittalnaht) wurde mit einem Bohrer der Firma Proxxon (Modell Minimot 40/E) mit einem Diamantschleifstift (Durchmesser 1 mm, Kugelform) eine Bohrlochtrepation unter Erhaltung der Dura vorgenommen. Von einer Zellsuspension mit  $2 \times 10^4$  C6-Zellen pro Mikroliter phosphatgepufferte

Kochsalzlösung (PBS) wurden 5 µl (entsprechend  $10^5$  C6-Zellen) in eine Mikroliterspritze (Mikroliter® #701, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) aufgezogen. Die Spritze wurde in einem Mikromanipulator eingespannt. Die Kanülenspitze wurde unter Sicht (Operationsmikroskop LEICA MZ6, Leica, Bensheim) auf die Dura aufgesetzt, dann 3 mm tief eingestochen und 0,5 mm zurückgezogen. Nach Injektion wurde das Bohrloch mit Knochenwachs verschlossen und der Hautschnitt vernäht.

#### **2.2.4 Medikamentenapplikation**

Bei den narkotisierten Tieren wurde in Rückenlage am rechten Bein entlang der Vena femoralis nach Haarrasur und Hautdesinfektion ein circa 1 cm langer Hautschnitt durchgeführt und die Vene vom umgebenden Bindegewebe unter dem Operationsmikroskop freipräpariert. Zur Injektion wurde eine UDS-Kanüle (Hoechst, Frankfurt a.M., G 30 kurz, 0,3 x 25 mm) verwendet, die über einen Silikonschlauch (Innendurchmesser 0,28 mm) flexibel mit einer Insulinspritze verbunden wurde. Nach Blutstillung wurde die Hautinzision mit einer Naht verschlossen. Die verwendeten Substanzen sind in der Tabelle 2 zusammengefasst. Die Dosierungen von Methyl- und Hexyl-5-ALA entsprachen äquimolaren Mengen einer 5-ALA-Dosis von 20 mg/kg. Die Dosis an Dexamethason richtet sich nach der in der Humanmedizin üblichen Dosis von 12 mg/Tag bei einem Patienten mit 70 kg.

**Tabelle 2**

Substanz	Konzentration	Dosierung
5-ALA (Medac GmbH, Hamburg)	10 mg in 1ml PBS gelöst	20 mg/kg Körpergewicht
	30 mg in 1ml PBS gelöst	100 mg/kg Körpergewicht
5-ALA-hexylester	10 mg in 1ml PBS gelöst	30 mg/kg Körpergewicht
5-ALA-methylester	10 mg in 1ml PBS gelöst	21 mg/kg Körpergewicht
Dexamethason (Ratiopharm GmbH, Ulm)	0,08 mg in 1ml NaCl gelöst	3 x 0,17 mg/kg Körpergewicht

### 2.2.5 Applikation der Aminolävulinsäure

Die tumortragenden Tiere wurden 9 Tage nach Inokulation der C6-Zellen erneut narkotisiert. In Bauchlage wurde nach Kopfrasur und Desinfektion der alte Hautschnitt wieder eröffnet und das alte Bohrloch freigelegt. Bei den Tieren, die eine Perfusion in das normale Gehirngewebe erhalten sollten, wurde wie schon unter 2.2.3 beschrieben ein entsprechendes Bohrloch angelegt.

Die Perfusion wurde mit Hilfe einer UDS-Kanüle (G30 kurz, 0,3 x25 mm, Hoechst, Frankfurt am Main) durchgeführt, die dafür über einen Silikonschlauch (Innendurchmesser 0,28 mm) mit einer Mikroliterspritze (Microliter, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) verbunden wurde. Die Kanüle wurde in einen Mikromanipulator eingespannt und entsprechend der Inokulation der C6-Zellen 3 mm tief in das Gehirn vorgeschoben und 1 mm zurückgezogen. Die Mikroliterspritze wurde in einen

Mikroperfusor ( SP100i, Digital Infusion Syringe Pump, World Precision Instruments Inc., Sarasota , Fl, U.S.A.) eingespannt. Nach Perfusion wurde das Bohrloch mit Knochenwachs wieder verschlossen und der Hautschnitt genäht.

### **2.2.6 Gehirnentnahme**

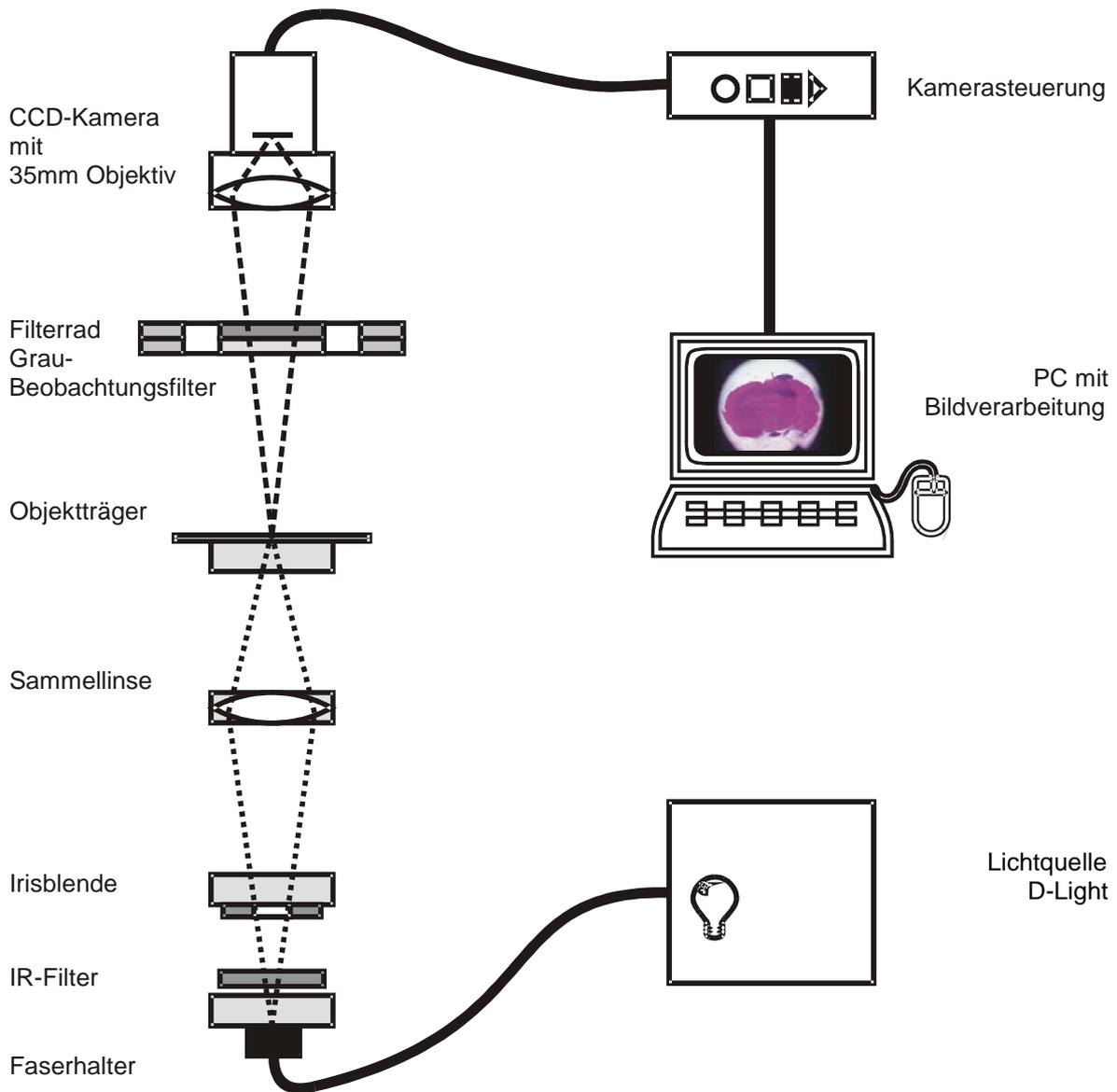
Die Tiere wurden 6 Stunden nach Medikamentenapplikation unter tiefer Aethernarkose getötet, danach die Gehirne entnommen. Vom Gehirn wurde durch koronare Schnittführung ein ca. 1 cm breiter Block, in dem sich der Tumor oder der Stichkanal der Perfusion befanden, entnommen. Der Block wurde in eine Einbettform gelegt, mit Tissue-Tek eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

## **2.3 Histologie**

Aus den Gehirnblöcken wurden in einem Gefriermikrotom 10 µm dicke Schnitte angefertigt. 2 Schnitte wurden jeweils auf einen Objektträger aufgebracht, anschließend 5 Schnitte verworfen. Jeder 5. Objektträger wurde getrocknet und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Objektträger mit den übrigen Schnitten wurden tiefgekühlt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 2.4 Makroskopische Bildbetrachtung

Zur makroskopischen Betrachtung der Gefrierschnitte (sowohl Kryoschnitte zur Fluoreszenzbetrachtung, als auch Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte) wurde der in Abbildung 3 beschriebene Aufbau verwendet. Zur Untersuchung wurde jeweils der Schnitt mit der maximalen Tumorausdehnung verwendet. Dabei wurden die Schnitte über eine Drei-Chip CCD Kamera (Tricam SLPal PDD, Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) mit 35 mm C-Mount-Objektiv auf einem PC mit Bildverarbeitungssoftware (Optimas 6.2, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, U.S.A.) dargestellt und aufgezeichnet. Die Beleuchtung des jeweiligen Schnittes erfolgte über eine Xenon-Lampe (Typ 615, Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland). Für HE-Schnitte wurde Weißlicht, für Fluoreszenzbeobachtungen wurde Licht mit einer Wellenlänge zwischen 410 nm und 450 nm verwendet. Bei Fluoreszenzschnitten wurden noch ein Infrarotfilter und ein Graufilter integriert, um eine bessere Darstellung zu ermöglichen. Zur weiteren Verbesserung der Darstellung wurden die RGB-Verstärkungsfaktoren der Kamera angepasst.

**Abbildung 3:**

## **2.5 Mikroskopische Fluoreszenzmessung**

### **2.5.1 Aufbau**

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Gefrierschnitte wurde ein inverses Mikroskop (DM IRBE, Leica, Deutschland) mit 1,6x Objektiv verwendet. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte durch seitliche Bestrahlung des Objektträgers unter einem Winkel von 45° mit Hilfe einer eigens dafür entwickelten Beleuchtungsvorrichtung.

Als Anregungslichtquelle diente eine Xenon-Lampe (Typ 615, Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland), deren Emissionsspektrum durch zwei geeignete Filter (Schott BG28/2mm und Kurzpass 445nm) auf den Bereich zwischen 410nm und 450nm beschränkt wurde. Ein in die Bestrahlungsvorrichtung integrierter Shutter begrenzte die Fluoreszenzanregung auf den Beobachtungszeitraum und verhinderte damit ein vorzeitiges Ausbleichen der Präparate.

In den Beobachtungsstrahlengang des Mikroskops wurde als Detektionsfilter ein 460 nm Langpass (D-Block, Leitz, Wetzlar, Deutschland) eingebracht, um das zurückfallende Anregungslicht zu unterdrücken.

### **2.5.2 Bilddokumentation**

Für die Dokumentation des mikroskopischen Fluoreszenzbildes wurde eine für diesen Zweck optimierte Drei-Chip CCD Kamera (Tricam SLPal PDD, Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) am Kameraausgang des Mikroskops angeschlossen. Um ein kontrastreiches Bild zu erhalten, wurden die RGB-Verstärkungsfaktoren der

Kamera angepasst und Integrationszeiten von 0,5 bis 2 Sekunden verwendet. Ein PC mit Bildverarbeitungssoftware (Optimas 6.2, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, U.S.A.) diente der Darstellung und Speicherung der Fluoreszenzbilder.

### 2.5.3 Spektroskopie

Zur Vermessung des Ausmaßes der Fluoreszenzakkumulation und zur Beurteilung der Fluoreszenzart erfolgte die spektroskopische Untersuchung der mikroskopisch beobachteten Fluoreszenz mit einem optischen Vielkanalanalysator (Princeton Instruments, Trenton, NJ, U.S.A.), der über ein Faserbündel an einem weiteren Kameraausgang des Mikroskops angeschlossen wurde. Das Fluoreszenzanregungslicht wurde mit einem 450 nm Langpass-Filter unterdrückt. Die Spektren wurden mit einer Spaltbreite von 250  $\mu\text{m}$  und einer Integrationszeit von 4 Sekunden aufgenommen. Die spektrale Auflösung betrug 2 nm. Das charakteristische Emissionsspektrum von PPIX mit Maxima bei 635 und 704 nm wird in situ überlagert von der strukturlosen Autofluoreszenz des Gewebes. Um eine Trennung beider Signalanteile zu ermöglichen, wurde jeweils vor 5-ALA-Applikation ein Spektrum der Autofluoreszenz aufgenommen und das Integral über die Intensitäten bei  $\lambda = 635 \pm 5$  und  $\lambda = 595 \pm 5$  nm gebildet. Da das Verhältnis beider Werte allein gewebespezifisch und entsprechend unabhängig von der 5-ALA-Applikation ist, konnte der Beitrag der Autofluoreszenz zum Gesamtsignal bei 635 nm auch nach der 5-ALA-induzierten Synthese von PPIX berechnet und abgezogen werden. Zur Einbeziehung der Autofluoreszenz in die Auswertung wurden die integralen Intensitäten bei  $500 \pm 5$  nm und  $595 \pm 5$  nm bestimmt und der oben genannte Peakwert für PPIX auf die jeweilige Autofluoreszenzintensität normiert.

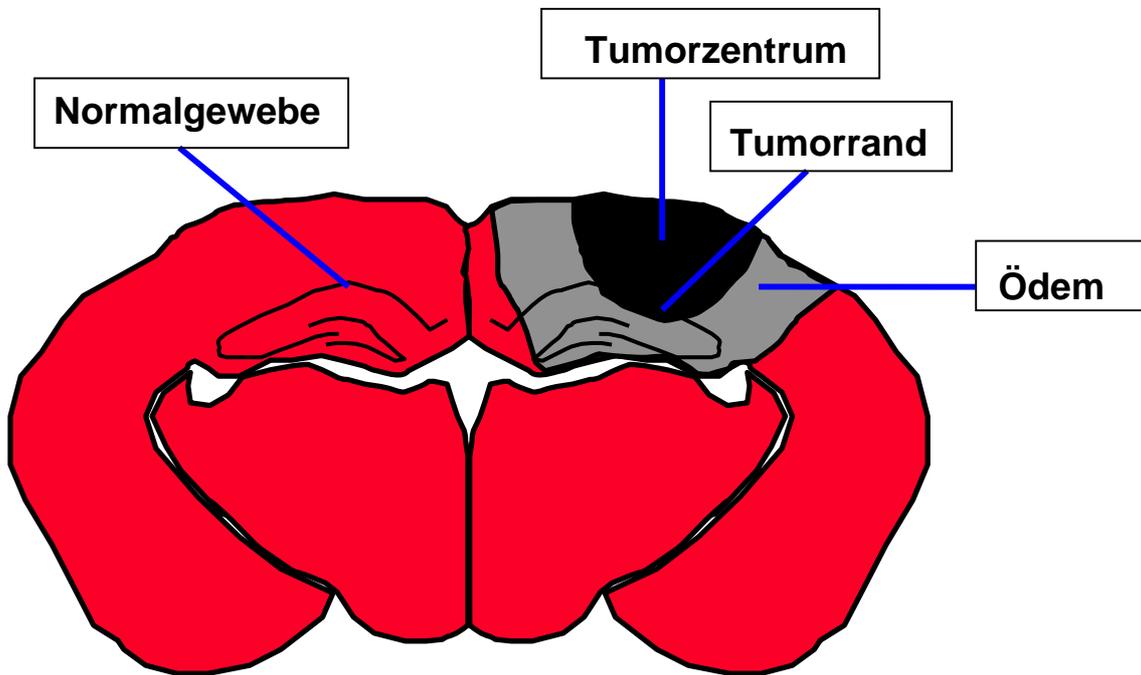
Von jedem Tier wurde im Schnitt mit der größten Tumorausdehnung an 4 Stellen jeweils die Fluoreszenz gemessen. Folgende Messorte wurden bei allen Tieren gewählt (siehe Abbildung 4):

- Das Zentrum des soliden Tumors
- Der Rand des soliden Tumors
- Die den Tumor umgebende Ödemzone, das heißt, der Bereich um den soliden Tumor, in dem das Gewebe ödematös verändert ist und nur noch vereinzelt Tumorzellen zu finden sind.
- Als 4. Ort wurde stellvertretend für normales Hirngewebe das Corpus callosum, etwa 1,5mm von der Mittellinie und histologisch ohne Tumor- oder Ödemnachweis, gewählt.

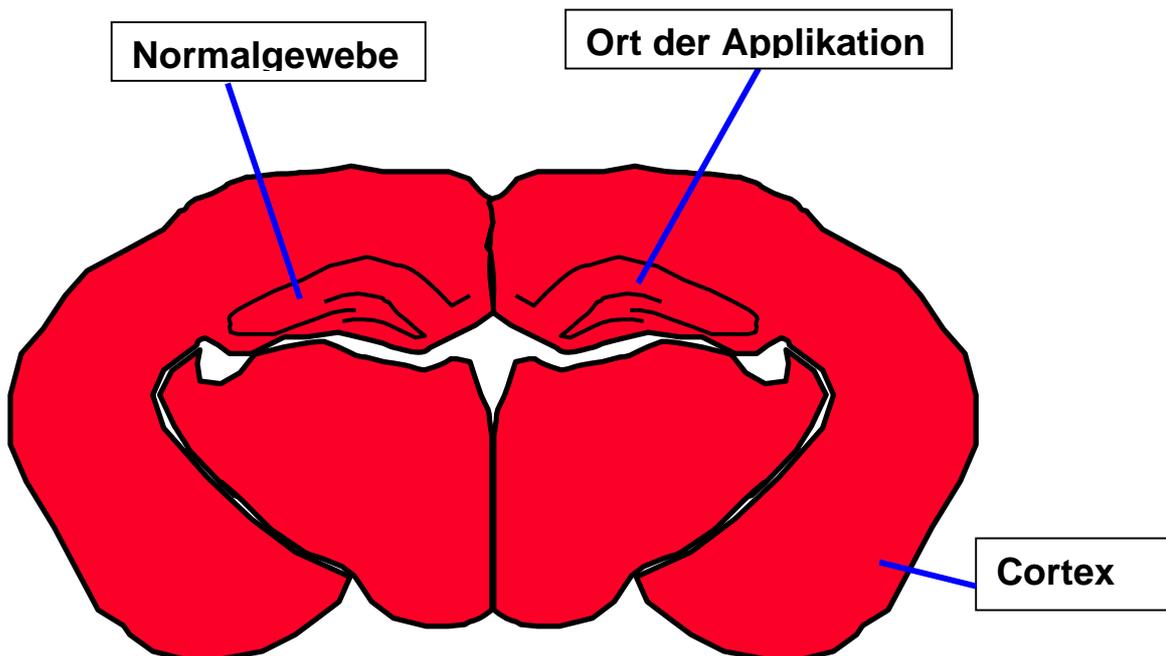
Bei den Tieren ohne Tumor, bei denen eine interstitielle Applikation mit 5-ALA vorgenommen wurde, wurde die Fluoreszenz im perfundierten Gewebe gemessen. Als Maß für die Fluoreszenz des Normalgewebes wurde im Corpus Callosum auf der contralateralen Seite gemessen (siehe Abbildung 5).

**Abbildung 4:**

Messorte für die Spektroskopie bei Versuchsgruppen mit Tumor

**Abbildung 5:**

Messorte für die Spektroskopie bei interstitieller Gabe



## 2.6 Statistische Methoden

Alle Werte sind als Mittelwerte mit und ohne Standardabweichung angegeben. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden durch Varianzanalyse (ANOVA) mit Fisher's PLSD als post-hoc Test geprüft. Unterschiede wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

### **3 Ergebnisse**

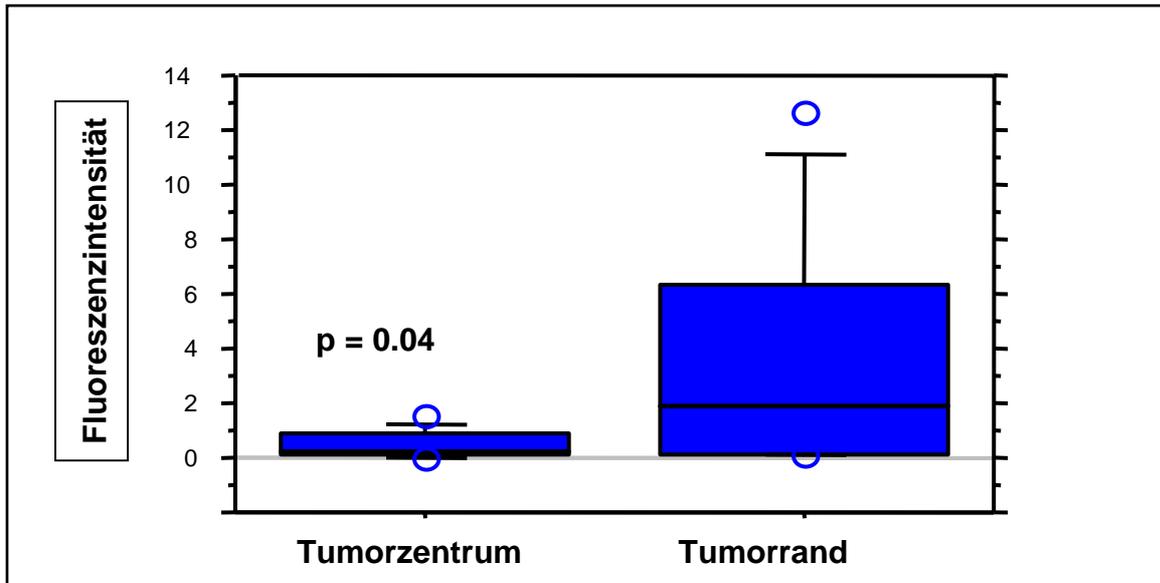
#### **3.1 Dosisabhängigkeit von 5-Aminolävulinsäure nach intravenöser Applikation**

Nach intravenöser Gabe von 5-ALA mit einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht zeigte sich 6 Stunden nach Applikation eine deutliche Rotfluoreszenz im Randbereich des Tumors. Auch der ödematös veränderte Bereich unmittelbar ausserhalb des erkennbaren Tumorgewebes stellte sich rotfluoreszierend dar. Dieser zusätzlich fluoreszierende Bereich reichte maximal 1 mm ins umliegende Gewebe. Im Gegensatz hierzu war die Fluoreszenz im Tumorzentrum deutlich geringer als im Randbereich. Das normale Gehirn auf der kontralateralen Seite fluoreszierte grün (siehe Abbildung 6).

In der Spektroskopie konnte diese Beobachtung bestätigt werden. So war die Fluoreszenz im Tumorzentrum signifikant ( $p=0,04$ ) niedriger als im Tumorrandgebiet (siehe Diagramm 1).

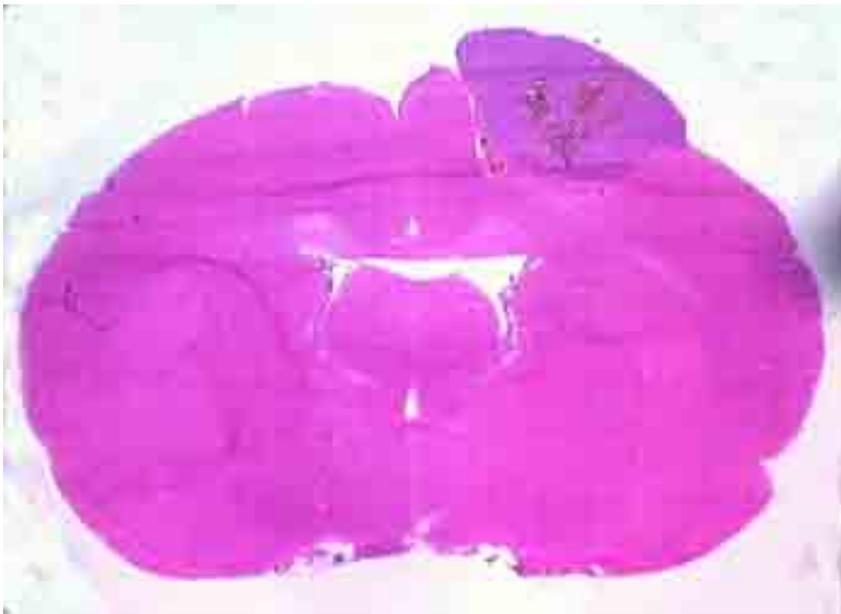
**Diagramm 1:**

Vergleich der spektroskopischen Fluoreszenzmessung im Zentrum des C6-Tumors und im Tumorrand 6 Stunden nach intravenöser Gabe von 20 mg 5-ALA/kg Körpergewicht (n = 6).

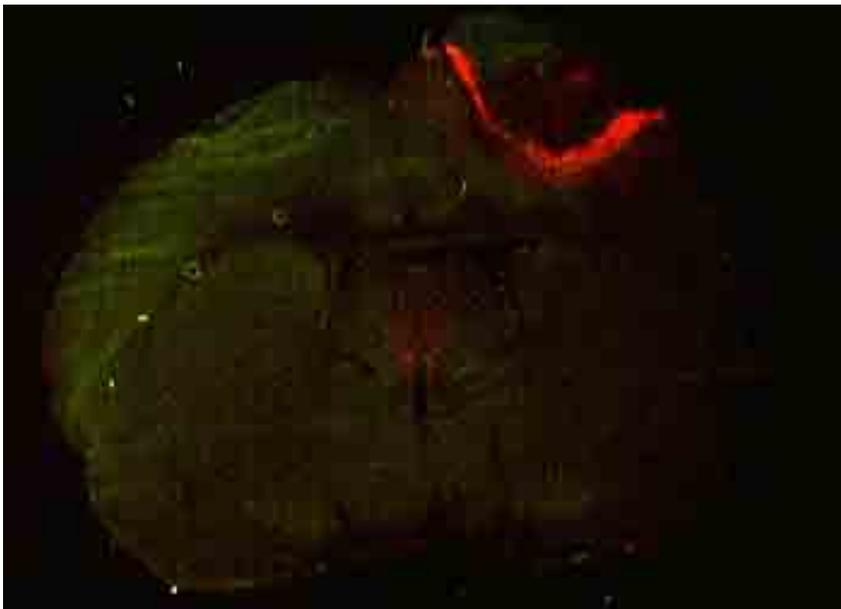


**Abbildung 6:**

Rattenhirn 6 Stunden nach Gabe von 20 mg/Kg Körpergewicht 5-ALA im HE- (a) und im Fluoreszenzschnitt (b). Der Randbereich des Tumors zeigt eine deutliche Akkumulation von PPIX, weniger das Zentrum. PPIX Fluoreszenz zeigt sich auch im ödematösen Hirngewebe unmittelbar ausserhalb des Tumors



a

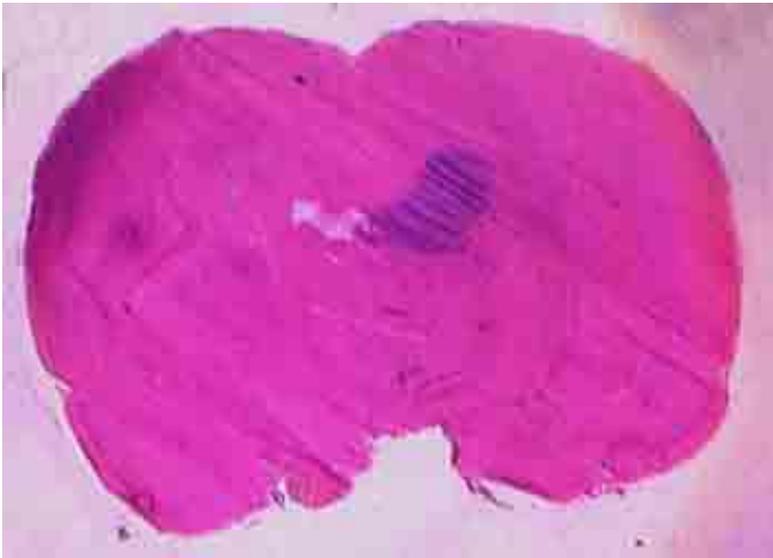


b

Nach Erhöhung der 5-ALA-Dosierung auf 100 mg/kg Körpergewicht stellte sich der gesamte Tumor rotfluoreszierend dar. Insbesondere das solide Tumorzentrum zeigte im Vergleich zum Tumorrand und zur Ödemzone eine starke Rotfluoreszenz. Wie schon bei der niedrigeren Dosierung stellte sich das Normalgewebe grün dar (Abbildung 7). Auch innerhalb der Ödemzone wurde PPIX sichtbar.

**Abbildung 7:**

Rattenhirn 6 Stunden nach Gabe von 100 mg/Kg Körpergewicht 5-ALA im HE- (a) und im Fluoreszenzschnitt (b).



a

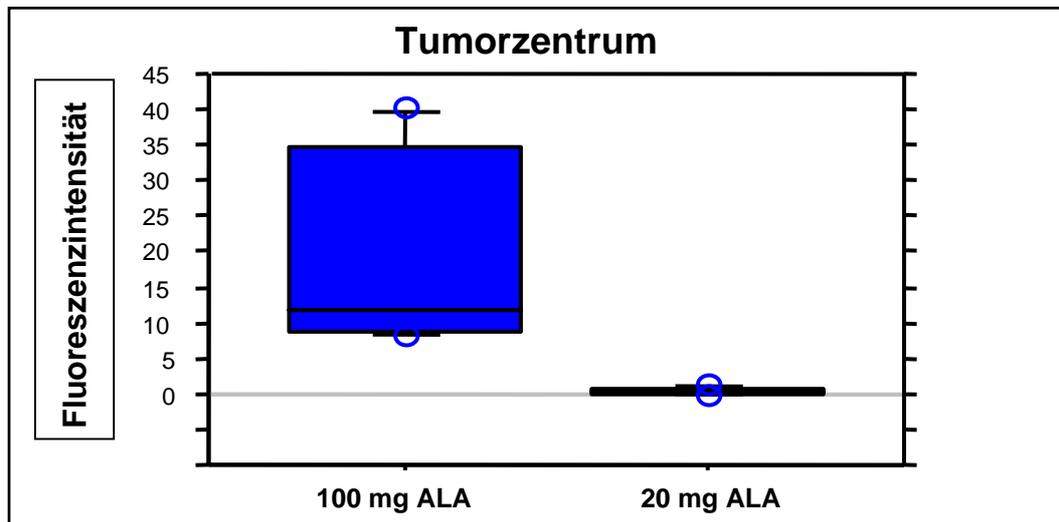


b

Bei der Fluoreszenzmessung mit dem Spektroskop konnte die größte Fluoreszenzintensität im Tumorzentrum gemessen werden. Diese war im Vergleich zur Dosierung mit 20mg/kg Körpergewicht 5-ALA deutlich erhöht (siehe Diagramm 2). Eine etwas geringere Intensität war im Randbereich des Tumors zu beobachten, die jedoch deutlicher war als bei 20 mg/kg (siehe Diagramm 3). In der Ödemzone konnte noch etwas Fluoreszenz gefunden werden, während im Normalgewebe kein Nachweis einer Fluoreszenz erbracht werden konnte.

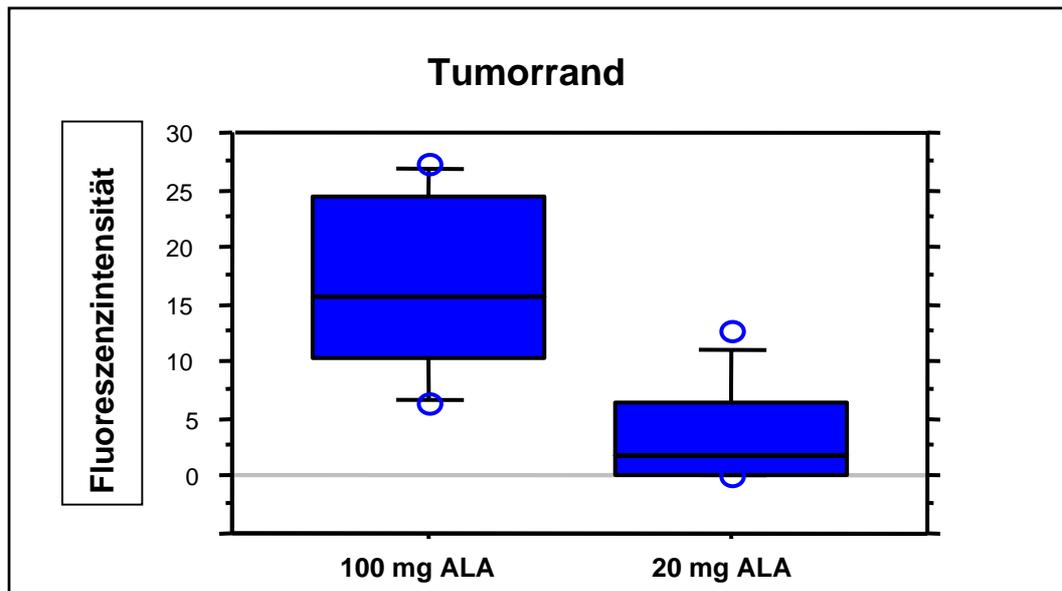
### Diagramm 2:

Vergleich der spektroskopischen Fluoreszenzmessung im Tumorzentrum zwischen der Dosierungen 100 mg 5-ALA/kg Körpergewicht (n = 6) und 20 mg 5-ALA/kg Körpergewicht (n = 6).



**Diagramm 3:**

Vergleich der spektroskopischen Fluoreszenzmessung im Tumorrand zwischen der Dosierungen 100 mg 5-ALA /kg Körpergewicht (n = 6) und 20 mg 5-ALA /kg Körpergewicht (n = 6).

**3.2 Einfluss von Kortikosteroiden**

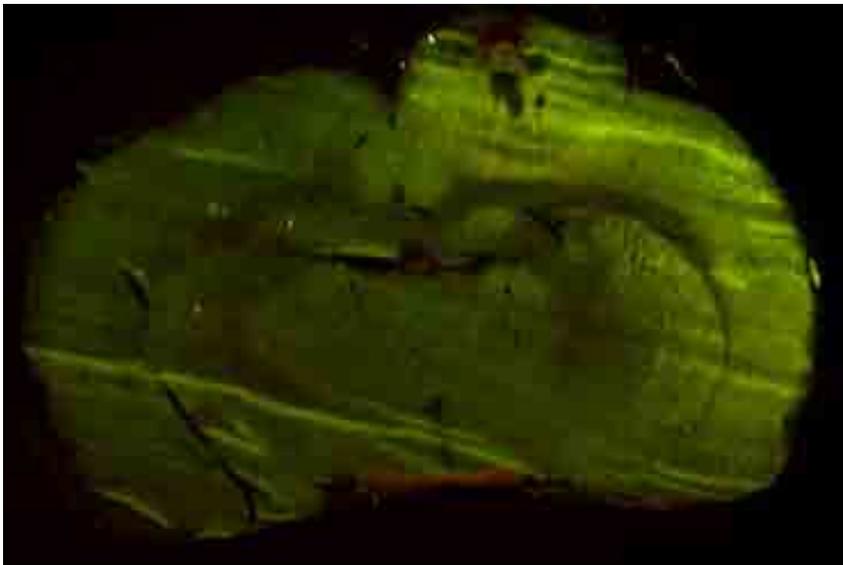
Zur Behandlung der Blut-Hirn-Schrankenstörung wurde einer Versuchsgruppe vor Gabe von 20 mg/kg Körpergewicht das Kortikosteroid Dexamethason verabreicht. Fluoreszenzmikroskopisch konnte nach Entnahme der Hirne nahezu keine Rotfluoreszenz im Tumorbereich mehr nachgewiesen werden. Lediglich im soliden Teil des Tumors deutete sich eine leichte Fluoreszenz an (siehe Abbildung 8).

**Abbildung 8:**

Mit Dexamethason vorbehandeltes Rattenhirn 6 Stunden nach Gabe von 20 mg 5-ALA /Kg Körpergewicht im HE- (a) und im Fluoreszenzschnitt (b).



a

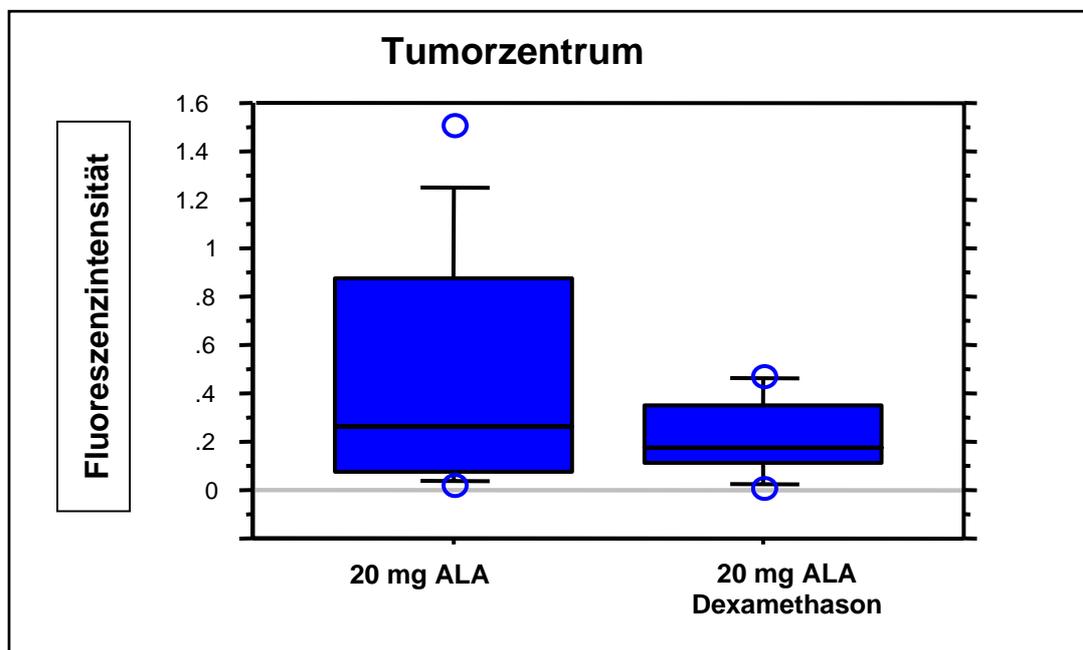


b

Im Tumorzentrum konnte spektroskopisch eine diskrete Fluoreszenzintensität gemessen werden. Im Vergleich zu Tieren ohne Steroidbehandlung war sie vermindert (siehe Diagramm 4). Im Tumorrand war hingegen keine Fluoreszenz spektrographisch nachweisbar. Diagramm 5 stellt den Vergleich zu Tieren ohne Steroidbehandlung her.

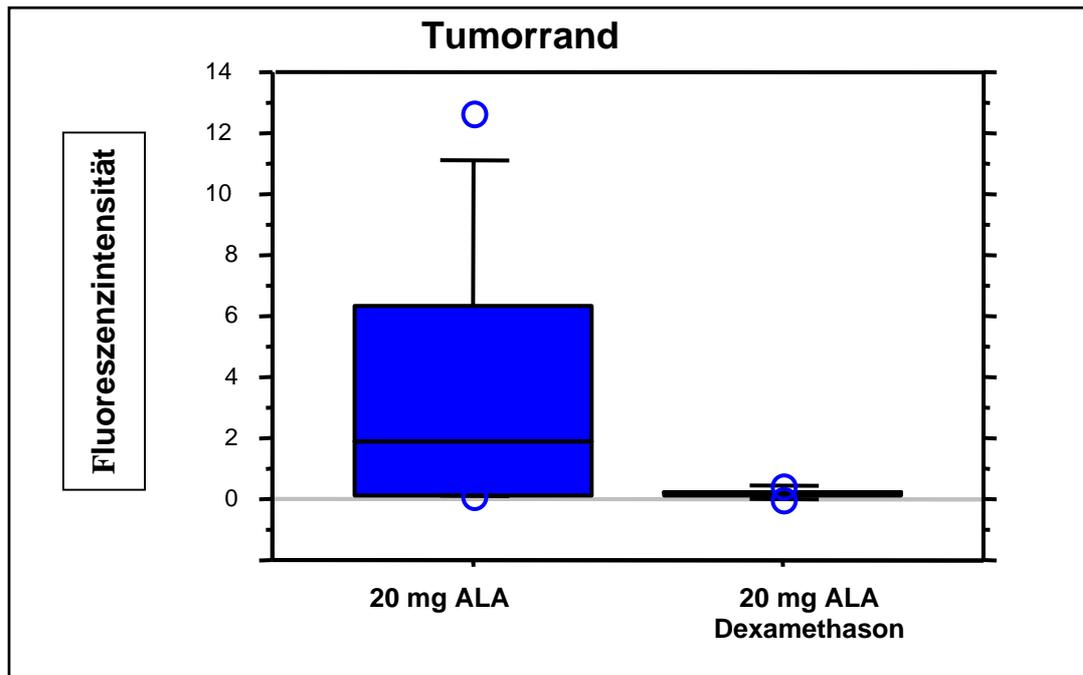
#### Diagramm 4:

Spektroskopische Fluoreszenzmessung im Tumorzentrum bei Versuchstieren nach alleiniger 5-ALA Gabe (20 mg/kg KG) (n = 6) im Vergleich zur Applikation von 5-ALA in gleicher Dosierung nach Steroidvorbehandlung (n = 6).



**Diagramm 5:**

Spektroskopische Fluoreszenzmessung im Tumorrand bei Versuchstieren nach alleiniger 5-ALA Gabe (20 mg/kgKG) (n = 6) im Vergleich zur Applikation von 5-ALA in gleicher Dosierung nach Steroidvorbehandlung (n = 6).

**3.3 Applikation von 5-Aminolävulinsäure-ester-derivaten**

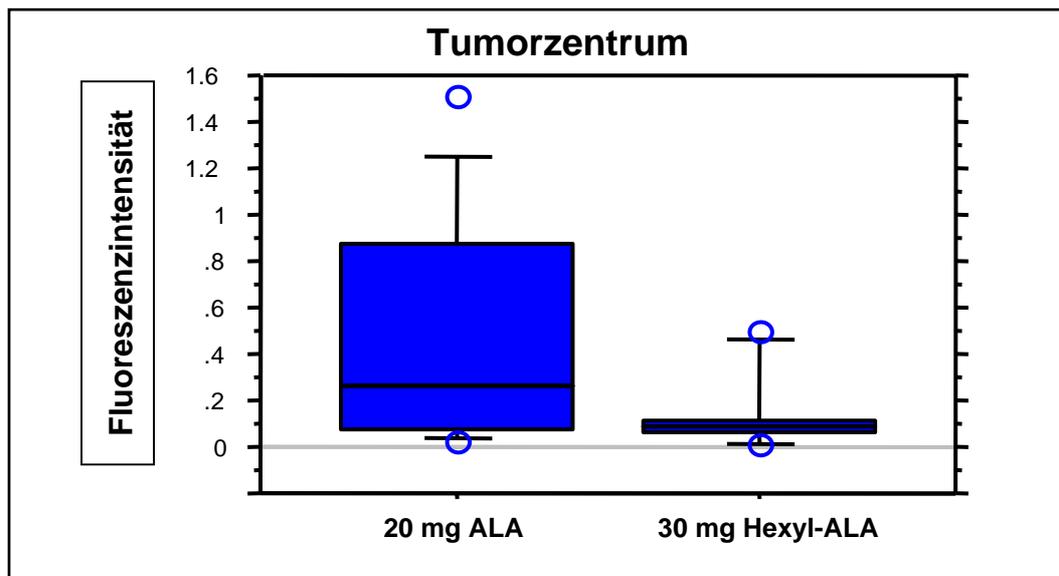
Mit dem Ziel eine bessere Penetration der Blut-Hirn-Schranke zu erreichen wurde einer Versuchsgruppe ein lipophiles Derivat von 5-ALA, der 5-ALA-hexylester, ein Derivat mit hohem Oktanol/Wasser-Partitionskoeffizienten, verabreicht. Die Dosierung wurde mit 30 mg/kg Körpergewicht äquimolar zu einer 5-ALA-Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht gewählt.

Bei diesen Versuchen zeigte sich im Tumor (sowohl im Zentrum als auch im Randbereich) keinerlei Rotfluoreszenz. Überraschend stellten sich jedoch alle Faserverbindungen, wie das Corpus Callosum oder die Fasern in der Capsula Interna, im gesamten Gehirn stark rotfluoreszierend dar (siehe Abbildung 9).

Spektroskopisch konnte diese Beobachtung bestätigt werden. So war die Intensität im Tumorzentrum im Vergleich zur 5-ALA-Applikation deutlich erniedrigt (siehe Diagramm 6). Das gleiche Ergebnis konnte im Tumorrand beobachtet werden (siehe Diagramm 7).

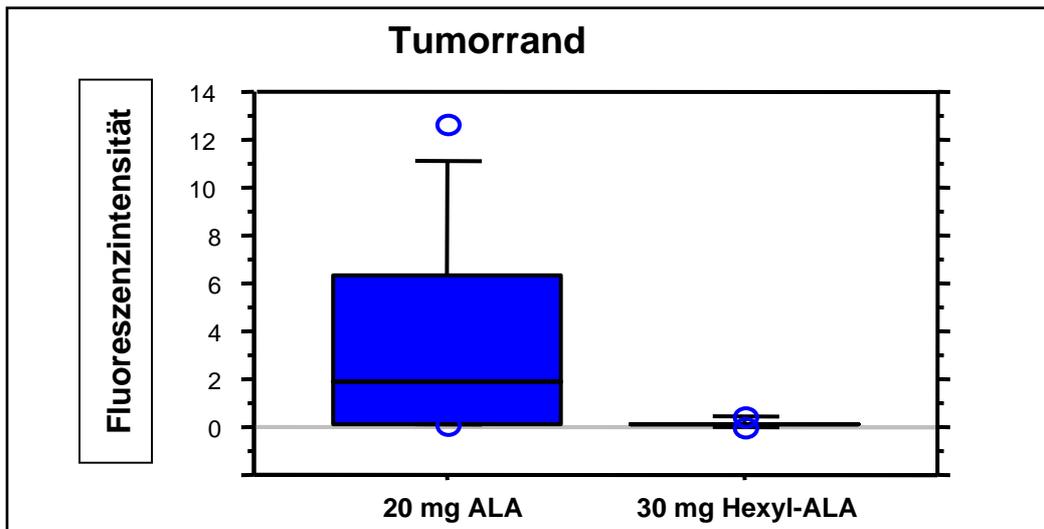
#### Diagramm 6:

Vergleich der spektroskopischen Fluoreszenzmessung im Tumorzentrum nach Gabe von 5-ALA in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht (n = 6) im Vergleich zur Messung bei Versuchstieren nach intravenöser, äquimolarer Gabe von 5-ALA-hexyl-ester (n = 6).



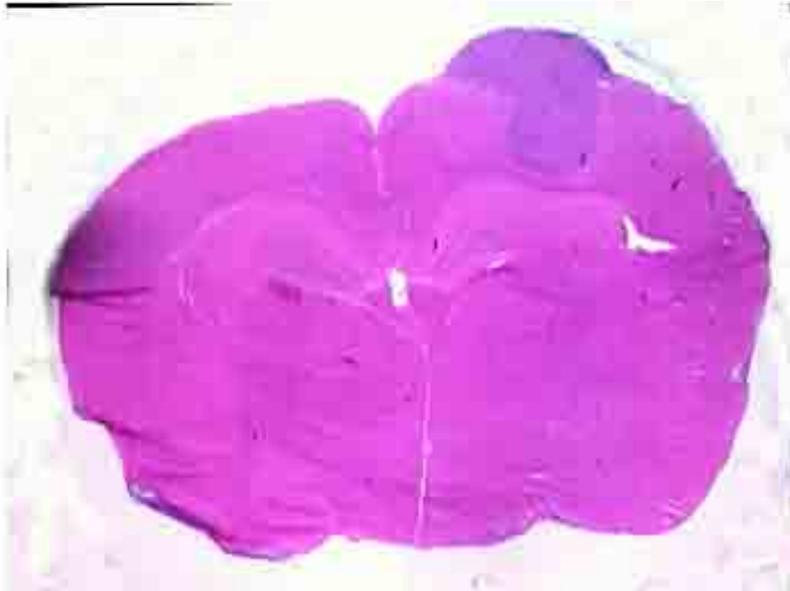
**Diagramm 7:**

Vergleich der spektroskopischen Fluoreszenzmessung im Tumorrand 6 Stunden nach Gabe von 5-ALA in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht (n = 6) im Vergleich zur Messung bei Versuchstieren nach intravenöser, äquimolarer Gabe von 5-ALA-hexyl-ester (n = 6).

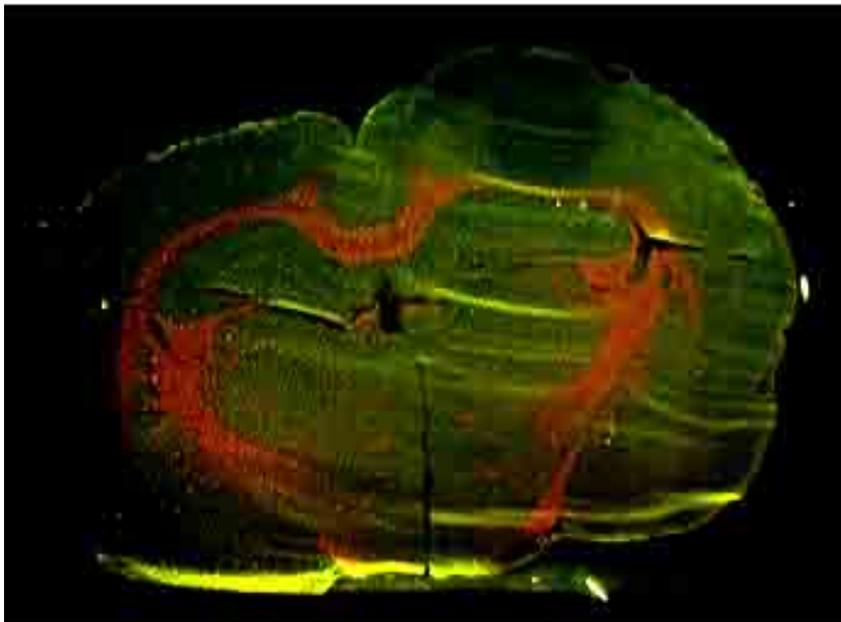


**Abbildung 9:**

Rattenhirn 6 Stunden nach Gabe von 30 mg/kg 5-ALA-hexyl-ester im HE- (a) und im Fluoreszenzschnitt (b).



a

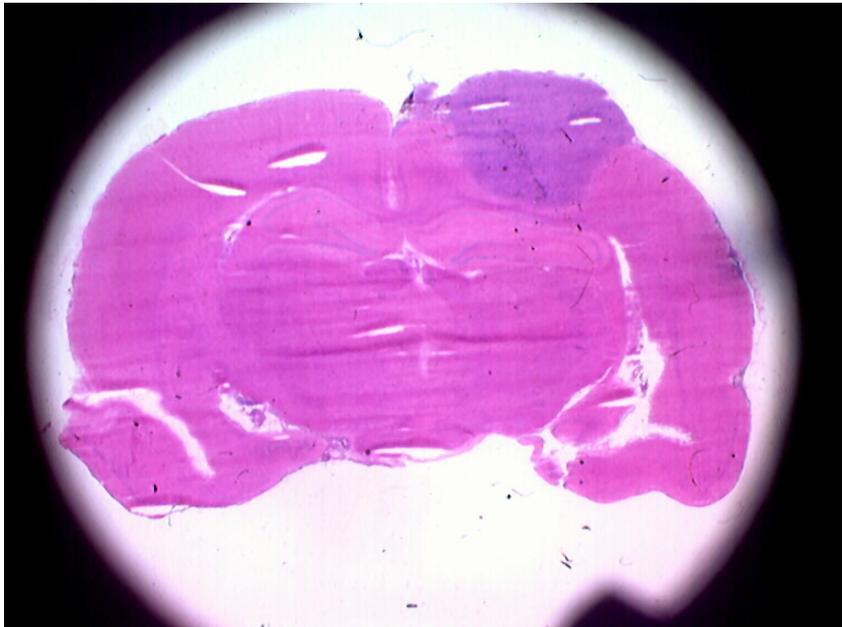


b

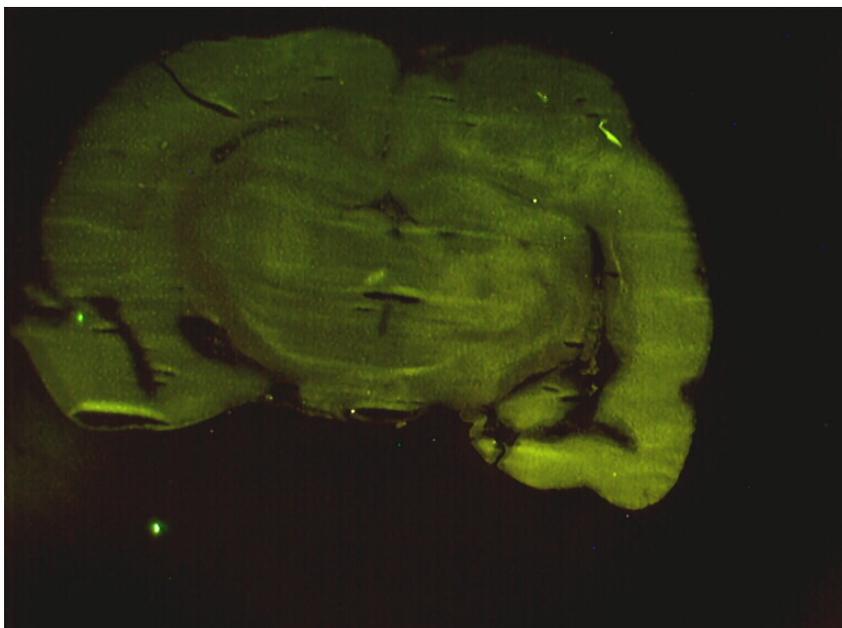
Nach Gabe von 5-ALA-methylester, einem Derivat mit niedrigen Oktanol/Wasser-Partitionskoeffizienten, der im Vergleich zu 5-ALA-hexylester eine deutlich verminderte Lipophilie besitzt, ließ sich nahezu keine Fluoreszenz im gesamten Gehirn erkennen. Es deutete sich lediglich eine geringe Rotfluoreszenz ähnlich zu 5-ALA-hexylester im Bereich der Capsula Interna und des Corpus Callosum an. Im gesamten Tumorbereich zeigte sich nur die grüne Autofluoreszenz. Abbildung 10 zeigt ein Beispiel einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme eines Gehirns nach Gabe von mit 5-ALA-methylester.

**Abbildung 10:**

Rattenhirn 6 Stunden nach Gabe von 30 mg/kg 5-ALA-methyl-ester im HE- (a) und im Fluoreszenzschnitt (b).



a



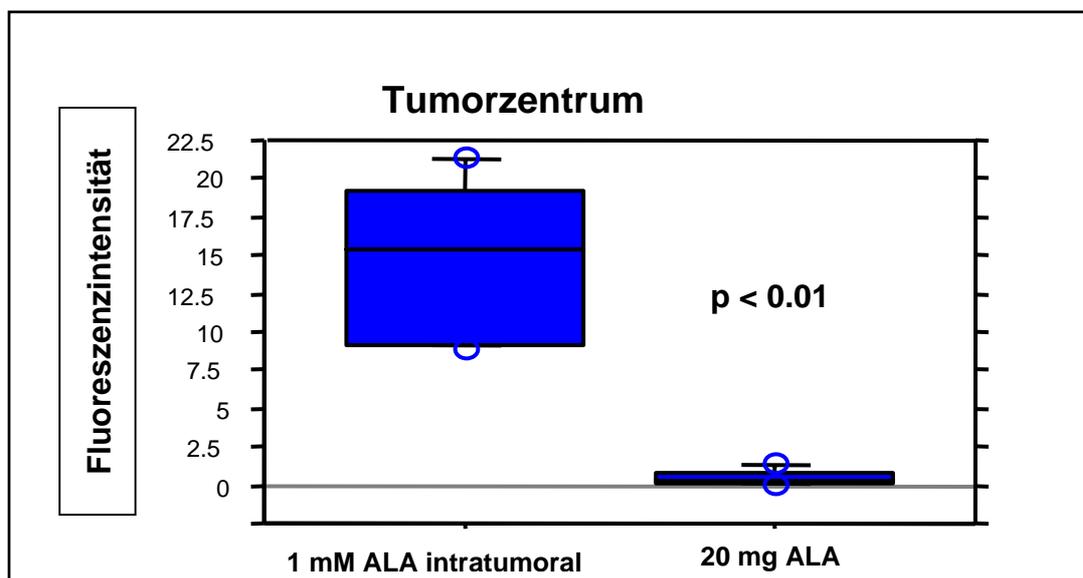
b

### 3.4 Intratumorale Applikation von 5-Aminolävulinsäure

Um die Blut-Hirn-Schranke vollständig zu umgehen, wurde bei Tieren einer Versuchsgruppe eine 1 mM, PBS-gepufferte (pH= 7.4 ) 5-ALA-Lösung interstitiell in den Tumor injiziert. Dabei zeigte sich eine Rotfluoreszenz sowohl im Tumorzentrum als auch am Tumorrand (siehe Abbildung 11). Diese war im Tumorzentrum signifikant höher ( $p < 0,01$ ) als die Fluoreszenz bei der intravenösen Verabreichung von 5-ALA (siehe Diagramm 8). Auch im Tumorrandbereich war die Fluoreszenz signifikant höher ( $p < 0,05$  Diagramm 9). Der Ödemsaum um den Tumor stellte sich ebenfalls stark rotfluoreszierend dar. Die Fluoreszenz reichte dabei weit entlang der angrenzenden Bahnen in das Normalgewebe. Das Normalgewebe auf der kontralateralen Seite zeigte die übliche Autofluoreszenz.

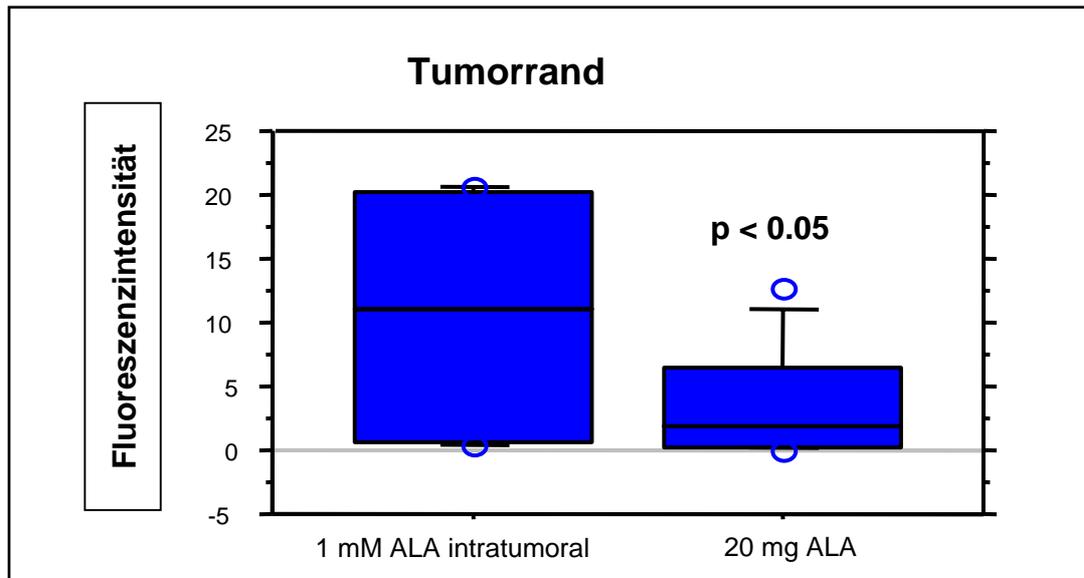
#### Diagramm 8:

Spektrographische Fluoreszenzmessung im Tumorzentrum von Versuchstieren nach intravenöser Applikation von 5-ALA (20 mg/kg KG) (n = 6) im Vergleich zur intratumoralen Applikation (1 mM) (n = 6).



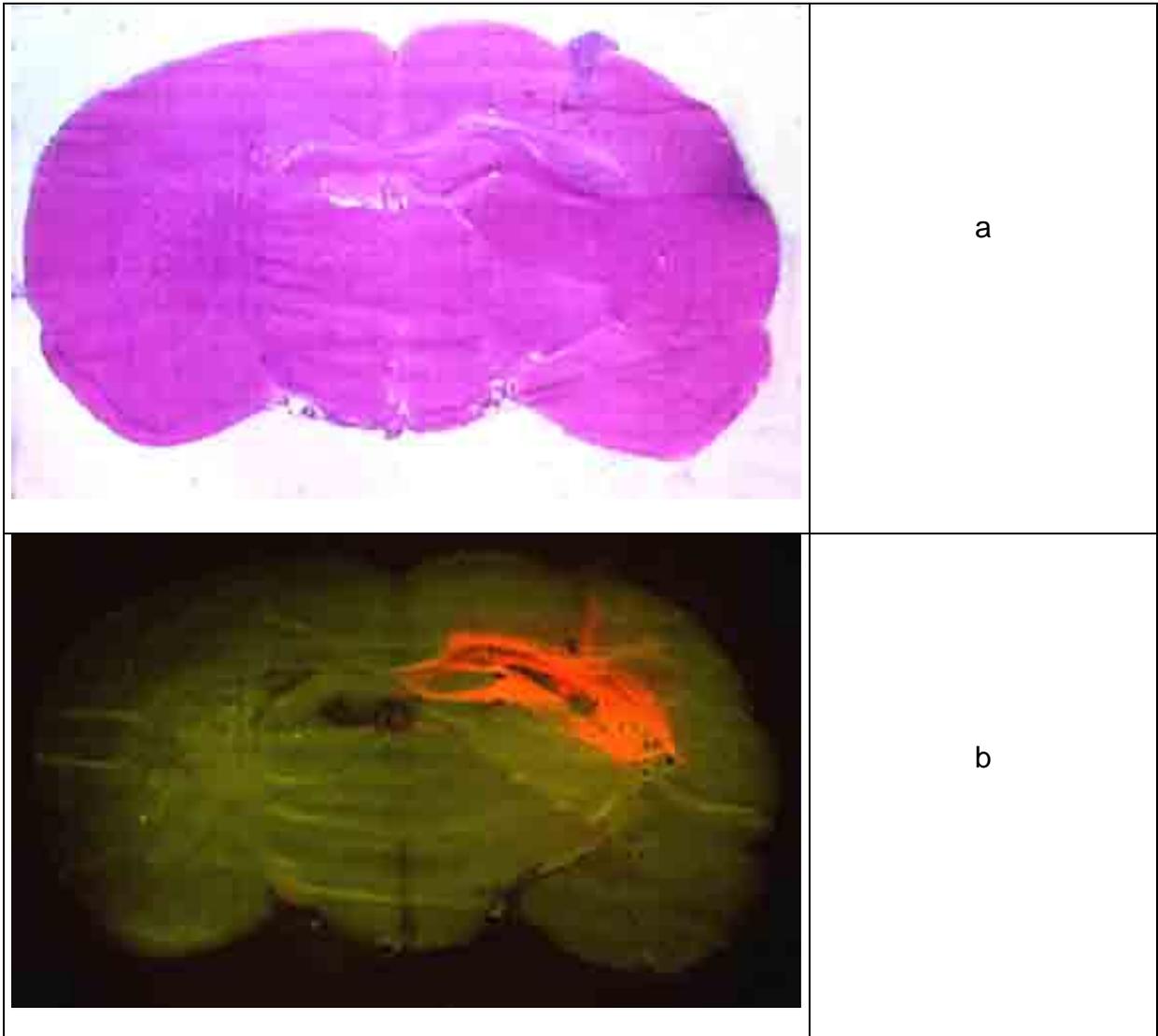
**Diagramm 9:**

Spektrographische Fluoreszenzmessung im Tumorrand von Versuchstieren nach intravenöser Applikation von 5-ALA (20 mg/kg KG) (n = 6) im Vergleich zur intratumoralen Applikation (1 mM) (n = 6).



**Abbildung 11:**

Rattenhirn nach intratumoraler Gabe von 5-ALA im HE- (a) und im Fluoreszenzschnitt (b).



### **3.5 Interstitielle Applikation von 5-Aminolävulinsäure ins Normalgewebe**

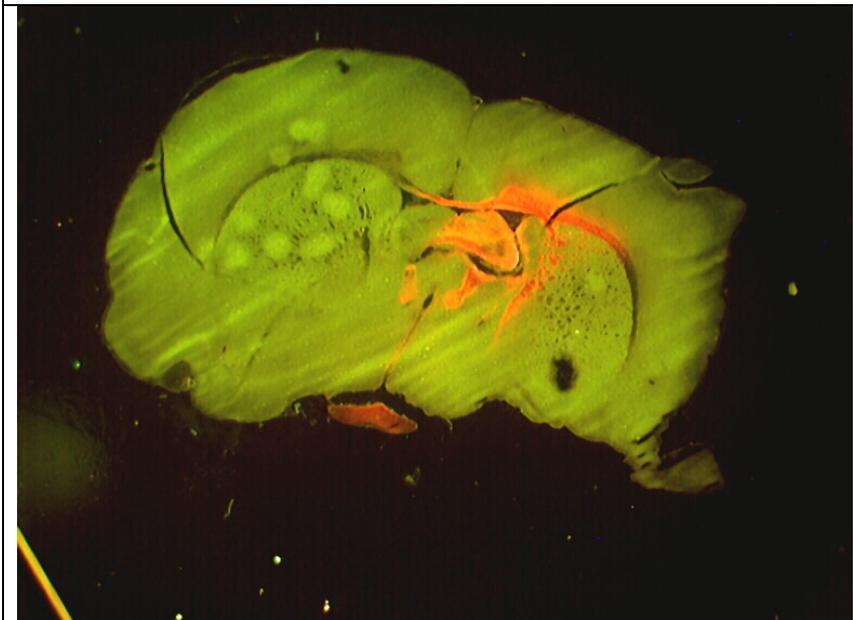
Zur Überprüfung, ob Normalgewebe generell in der Lage ist 5-ALA in PPIX umzuwandeln, wurde bei einer zusätzlichen Kontrollgruppe eine 1 mM, gepufferte 5-ALA Lösung interstitiell ins Gehirn appliziert. Dabei konnte eine hohe Fluoreszenzausbeute in der Nachbarschaft der Applikationsstelle nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12).

**Abbildung 12:**

Rattenhirn ohne Tumor nach interstitieller Gabe von 5-ALA im HE- (a) und im Fluoreszenzschnitt (b).



a

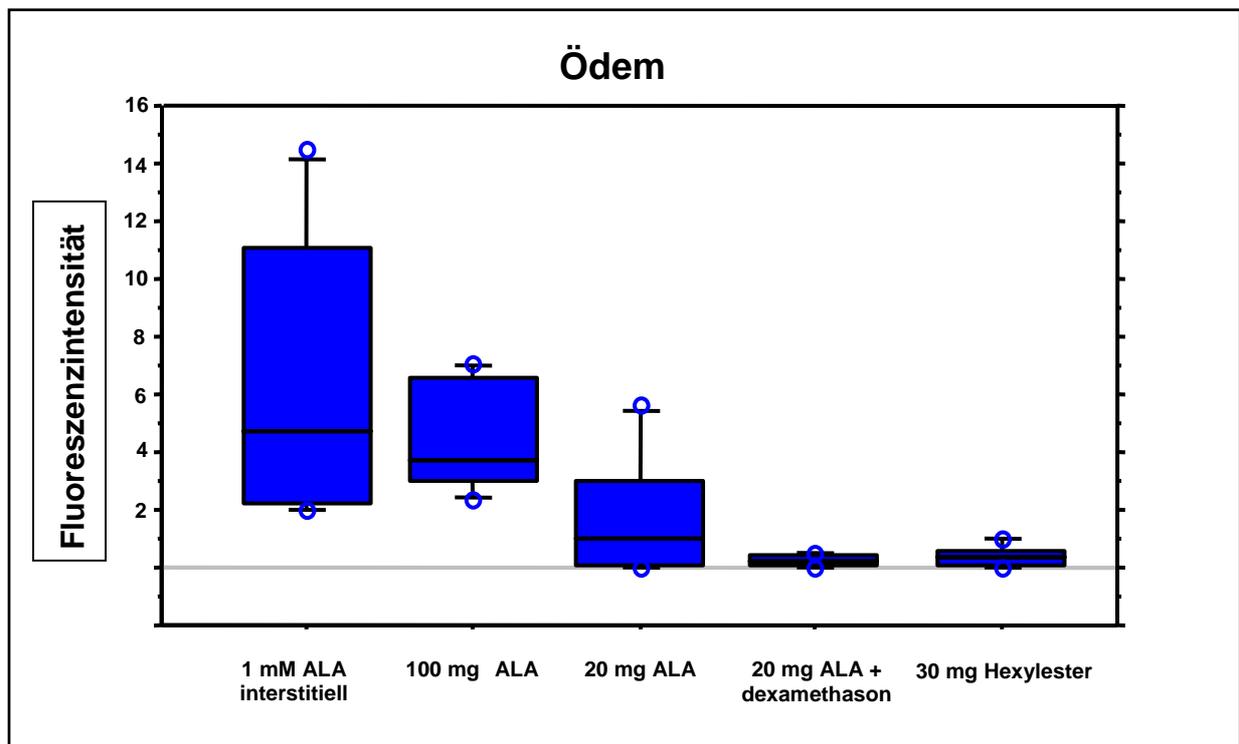


b

### 3.6 Fluoreszenzintensität im Ödem

Bei allen Gehirnen wurde die Intensität der unspezifischen Fluoreszenz im ödematösen Gewebe vermessen und in einer Grafik (siehe Diagramm 10) aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass mit der niedrigen Dosierung von 20 mg/kg die geringste unspezifische Fluoreszenz im Ödem nachweisen ließ. Diese war deutlich höher bei der höheren Dosierung von 100 mg/kg und am höchsten bei der interstitiellen Infusion von 5-ALA.

Diagramm 10:



### 3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend zeigte sich, dass bei der systemischen Applikation von niedrigdosierten 5-ALA (20 mg/kg) hauptsächlich der randständige Teil des Tumors fluoreszierte. Die Fluoreszenzausbeute war im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen am niedrigsten.

Bei der intravenösen Applikation von 5-ALA in der Dosierung 100 mg/kg stellte sich hingegen der gesamte Tumor rotfluoreszierend dar. Mit dieser Dosis ließ sich im Tumorgewebe die höchste Fluoreszenzintensität erzielen. Auch das umliegende Ödem fluoreszierte deutlich.

Überraschenderweise führte die Verabreichung von Estern zur Fluoreszenz aller Nervenbahnen. Der Tumor selbst ließ keine nennenswerte Fluoreszenzakkumulation erkennen.

Bei der intratumoralen Applikation von 5-ALA war die Fluoreszenzverteilung unspezifisch. Dies zeigte die Messung der Fluoreszenz im umliegenden Gewebe.

Bei der interstitiellen Injektion von 5-ALA ins Normalgewebe konnte gezeigt werden, dass normales Hirngewebe in der Lage war, 5-ALA in Protoporphyrin IX umzusetzen.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Grundlagen**

Um die im Rahmen dieser Untersuchung erhobenen Befunde besser einordnen zu können, bedarf es einer kurzen Wiederholung von Physiologie und Pathophysiologie der Blut-Hirn-Schranke sowie ihrer Beeinflussbarkeit durch Kortikosteroide, wie sie im folgenden kurz dargestellt werden sollen.

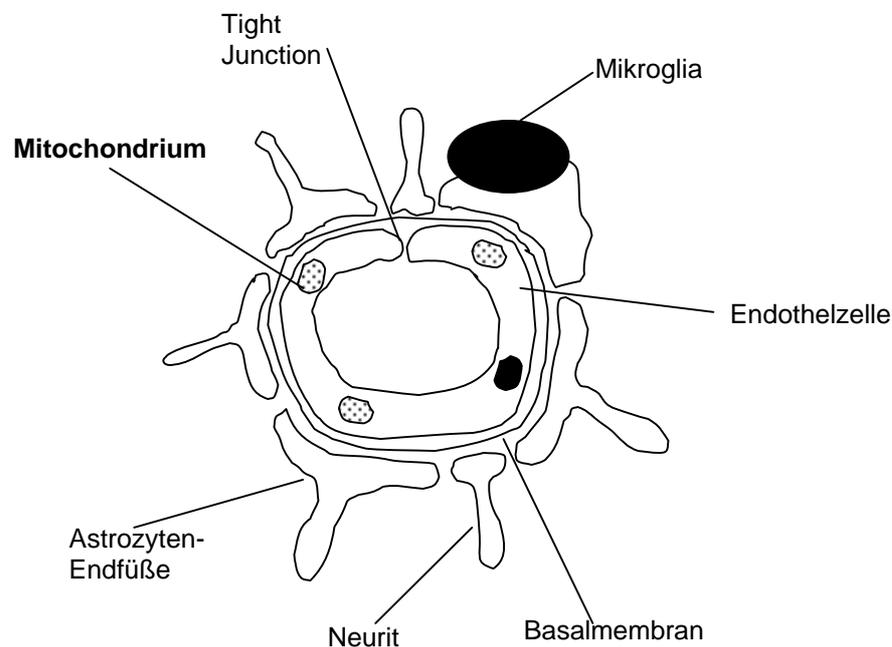
#### **4.1.1 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke**

Im Unterschied zu zahlreichen Organen ist der Stoffaustausch am Endothel des Gehirns durch die sogenannte Blut-Hirn-Schranke deutlich eingeschränkt. Dieser Schrankeneffekt hat seine morphologische Grundlage in den Tight junctions der Endothelzellen. Sie ist Folge einer bestimmten Anordnung der Gewebsschichten um die Hirnkapillaren. Die Astrozytenfortsätze legen sich der Basallamina eng an, die Endothel und Perizyten umgibt. Die Kapillarendothelien sind durch zahlreiche Zonulae occludentes miteinander verbunden und für bestimmte Stoffe undurchlässig. Ein perikapillärer Spalt oder Raum besteht nicht (siehe Abbildung 13).

In Geweben außerhalb des zentralen Nervensystems verläuft der Substanztransport vom Blut entweder durch die Endothelzellen (transzellulärer Transport) oder via Spaltöffnungen zwischen den Endothelzellen (interzellulärer Transport). Im ersten Fall vermitteln Vesikel oder dünne Endothelzellmembranen (Fenestrierung) den Stofftransport. Der interzelluläre Transport hingegen verläuft über gap junctions, die auch für größere Moleküle durchlässig sind. Tight junctions bilden jedoch

unpassierbare Barrieren, die selbst kleinere wasserlösliche Moleküle kaum passieren lassen (Berne et al. 1993, Bertram et al. 1988, Betz et al. 2001, Schmidt et al. 1990).

**Abbildung 13:** Morphologie des Kapillarendothels im ZNS



Bei den Endothelzellen der Hirnkapillaren ist sowohl der transzelluläre als auch der interzelluläre Transport erheblich eingeschränkt. So ist die Anzahl von Transportvesikeln im Vergleich zu Kapillaren anderer Organe vergleichsweise niedrig und die Fenestrierung fehlt gänzlich. Auch fehlen in weiten Bereichen des Gehirns die für den interzellulären Transport wichtigen gap junctions (Tewes et al. 1997).

Bei Untersuchungen zur Blut-Hirn-Schranke zeigte sich, dass lipophile Substanzen relativ leicht in das Gehirn eindringen, während wasserlösliche Substanzen nicht durchgelassen werden. Dies wird durch den Aufbau der äußeren

Endothelzellmembran erklärt, die sich wie andere Zellmembranen aus einem zweidimensionalen Lipidlayer zusammensetzt. Dabei sind die hydrophilen Enden nach außen gewandt. Nur lipophile Substanzen können diese Lipidmembran permeieren und somit aus dem Blut in das Gehirn gelangen. Allerdings benötigt das Gehirn auch wasserlösliche Substanzen wie Glucose oder bestimmte Aminosäuren. Da diese Stoffe aufgrund ihres hydrophilen Charakters nicht durch die Lipidschichten diffundieren können, müssen spezifische Transportsysteme diese Substanzen aktiv durch die Endothelzellen hindurchschleusen. Dabei weisen diese Carriersysteme eine sehr hohe Substratspezifität auf (Tewes et al. 1997).

Durch die außergewöhnlichen Eigenschaften der zerebralen Endothelzellen hinsichtlich ihrer Permeabilität weist das Gehirn ein stabiles inneres Milieu auf. Es wird sichergestellt, dass Schwankungen in der Blutkonzentration von Nährstoffen, Hormonen oder Ionen keine direkten Auswirkungen auf die synaptische Funktionen der Nervenzellen haben (Schmidt et al. 1990).

#### **4.1.1 Pathogenese des Hirnödems**

Klatzo definierte das Hirnödem als abnormale Flüssigkeitsansammlung, die mit einer Volumenzunahme des Hirngewebes assoziiert ist (Klatzo et al. 1967). Dabei unterschied er in zwei Formen des Ödems, das vasogene und das zytotoxische Hirnödem.

Am häufigsten kommt das vasogene Hirnödem vor. Es entsteht durch eine primäre Schädigung der Blut-Hirn-Schranke in der Umgebung von Herdprozessen (perifokales Ödem) wie Hirntumoren, Verletzungsherden, Massenblutungen und entzündlichen Läsionen. Ursache des Ödems ist eine durch die fokale Läsion

hervorgerufene Permeabilitätssteigerung der Kapillarendothelien. Das vasogene Ödem entwickelt sich in drei Phasen, den Phasen der Exsudation, der Ausbreitung und der Auflösung.

In der exudativen Phase tritt aufgrund einer gestörten Blut-Hirn-Schranke eine Extravasation von Flüssigkeit im Bereich der Schädigung auf. Die Flüssigkeit breitet sich vornehmlich in der weißen Substanz aus, da die parallel angeordneten Bahnen der weißen Substanz weniger Widerstand bieten als die im Vergleich kompakte und zellreiche Kortex. Eine operative Entfernung der fokalen Schädigung führt unverzüglich zu einer Abnahme des Ödems (Blasberg et al. 1980, Gade et al. 1990, Klatzo et al. 1958, Long et al. 1982, Samdani et al. 1997).

Andererseits beruht das zytotoxische Hirnödeme auf einer toxischen Schädigung vor allem der Astrozyten durch Zellgifte wie Zyanid oder Kohlenmonoxid mit entsprechender Zellschwellung durch Zusammenbruch der Ionengradienten und Flüssigkeitseinstrom vom extra- in den - intrazellulären Raum. Eine primäre Schädigung der Blut-Hirn-Schranke lässt sich nicht nachweisen. Das ischämische Hirnödeme entspricht seinem Wesen nach dem zytotoxischen Ödeme, da der mit der Ischämie einhergehende Energiemangel ebenfalls zum Zusammenbruch der Ionengradienten führt (Go et al. 1979, Riede et al. 1995).

#### **4.1.2 Hirnödeme und Glukokortikoide**

Glukokortikoide, wie Dexamethason, werden zur Therapie des vasogenen Hirnödems eingesetzt. Glukokortikoide schützen die Blut-Hirn-Schranke, was einer Verringerung der Permeabilität der Kapillaren bewirkt (Eisenberg et al. 1970), und zur einer Erniedrigung der Glucoseverwertung im Gewebe führt (Pappius et al. 1984).

Auch wird die Liquorproduktion durch Steroide gehemmt (Mayman et al. 1972) und die Liquorabsorption verstärkt (Love et al. 1984). Criscuolo et al. beschrieben 1989 eine Unterdrückung der Produktion von Enzymen wie den vascular permeability factor (VPF) und den vascular endothelial growth factor (VEGF) in kultivierten Zellen von malignen Gliomen durch Gabe von Dexamethason. Dies führe in Summe zu einer Abnahme des Hirnödems (Criscuolo et al. 1989).

#### **4.1.3 5-Aminolävulinsäure und die Blut-Hirn-Schranke**

Die Literatur bietet Hinweise dafür, dass 5-ALA mit einer Anzahl von Transportern im Gehirn interagiert, z.B. mit Transportern für GABA, Glutamat und Di- bzw. Tripeptide (Becker et al. 1980, Cheeks et al. 1986, Doring et al. 1998, McLoughlin al. 1984).

Ennis et al. versuchten den Transport von 5-ALA durch die Blut-Hirn-Schranke mit [<sup>14</sup>C]markiertem 5-ALA zu charakterisieren. Es zeigte sich an der Blut-Hirn-Schranke ein nur halb so großer Influx von 5-ALA im Vergleich zum Influx in den Liquor. Am Plexus choroideus fand sich sogar ein 56 mal höherer Influx als an der Blut-Hirn-Schranke. Da sich die 5-ALA-Aufnahme nicht durch Zugabe von unmarkiertem 5-ALA unterdrücken ließ, konnte ein Carrier-vermittelten Transport ausgeschlossen werden (Ennis et al. 2003). Auch konnten Ennis et al. zeigen, dass der 5-ALA-Influx deutlich niedriger war als der Influx von Inulin, einer Verbindung mit ähnlichem Molekulargewicht. Inulin passiert lediglich durch Diffusion die Blut-Hirn-Schranke. Ennis führte dies auf die vergleichsweise niedrige Lipidlöslichkeit von 5-ALA im Vergleich zum Inulin zurück (Keep et al. 2001).

## **4.2 Eignung des C6 Gliommodells für die vorliegende**

### **Untersuchung**

Das C6-Gliom der Ratte wird als Tumormodell zur Evaluierung von neuen Therapieformen bei malignen Gliomen seit Jahren eingesetzt (Breyer et al. 2000, Lee et al. 1991, Maron et al. 1996). Vorteil dieses Modells ist seine relativ hohe Zuverlässigkeit, innerhalb von 9 - 10 Tagen Tumore zu induzieren und ihr rasches Wachstum. Sie eignen sich zur Beantwortung spezifischer, neuroonkologischer Fragestellungen, da sie zahlreiche pathophysiologischen Besonderheiten maligner Gliome des Menschen widerspiegeln (San Galli et al.1989). Da für dieses Modell keine immunsuprimierten Tiere benötigt werden, stellt es für die Ausstattung des Labors und der Käfige keine hohen Anforderungen.

Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten mittels C6-Zellen Gliome zu induzieren, je nach verwendeter Implantationstechnik. Zum einen besteht, wie in dieser Arbeit angewandt, die Möglichkeit der stereotaktischen Inokulation einer C6-Zellsuspension in den Cortex. Zum anderen kann ein C6-Tumor durch Implantation von C6-Spheroiden hergestellt werden. Nachteil der zweiten Methode ist jedoch, dass diese Tumore gegenüber dem umgebenden Gewebe abgekapselt sind und eher Hirnmetastasen gleichen als invasiv wachsenden, malignen Gliomen (Farrell et al. 1987, San Galli et al. 1989). Verwendet man Injektionen einer Zellsuspension, so entstehen Tumore, die den malignen Gliomen ähnlicher sind, mit pleomorphen Zellkernen, einer hohen Mitoserate und Nekrosearealen (San Galli et al. 1989). Zudem finden sich ab dem vierten Tag nach stereotaktischer Injektion einer C6-Zellsuspension einzelne invadierende Gliomzellen. Nach 2 – 3 Wochen erreichen

diese Zellen auch weiter entfernte Hirnareale (Nagano et al. 1993). Auch finden sich, ähnlich dem humanen Glioblastom, Bereiche mit Neovaskularisation entlang endothelialer Basalmembranen und proteinreiche Ödemflüssigkeit (Auer et al. 1981, Nagano et al. 1993, Whittle et al. 1998).

Trotz der nachweisbaren Infiltration, der Ödem- und Nekrosebildung weisen C6-Gliome nicht alle Charakteristika menschlicher Glioblastome auf: Humane Glioblastome sind deutlich heterogener und haben eine höhere „Invasions-Kapazität“ (Grobben et al. 2002, Pilkington et al. 1990, Goldbrunner et al. 2004). Darüber hinaus ist bekannt, dass C6-Zellen deutlich schneller wachsen als humane Gliomzelllinien, was zu einer raschen Kompression des umliegenden Hirngewebes führt. Dies kann ein abgegrenztes Tumorwachstum vortäuschen, während das infiltrative Wachstum der C6-Zellen übersehen wird. Die mikroskopische Betrachtung der C6-Gliome belegt jedoch den invadierenden Charakter dieser Zelllinie (Goldbrunner et al. 2004).

Trotz nachweisbarer Unterschiede des C6-Gliommodells zum malignen Gliom des Menschen, der Erkrankung, die untersucht werden soll, schien uns das C6-Gliommodell zur Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Untersuchung geeignet. Für die Akkumulation von ALA-induzierten Porphyrinen sind zwei Eigenschaften von malignen Gliomen von Bedeutung, die Tumorzellinvasion und – wesentlicher noch – das Tumorödem. Beide pathophysiologisch relevanten Erscheinungen sind im C6-Gliommodell verwirklicht.

Größere Sorge bei der Untersuchung machte zunächst die teilweise unterschiedliche Größe und Ausbreitung der Tumore. Als Ursache für die Größenvariationen war als Faktor eine schon in der Kultur nachweisbare, unterschiedliche proliferative Aktivität

identifizierbar. So musste zum Beispiel trotz gleicher Bedingungen in einer Zellkulturflasche bereits nach 2 Tagen eine Zelltrennung vorgenommen werden, in der anderen Zellkulturflasche erst nach 3 Tagen. Man musste davon ausgehen, dass sich dies natürlich auch auf die Tumorgroße am Tag 9 nach Inokulation auswirkte.

Trotz stereotaktischer Implantation des Tumors mit geplantem Zielpunkt im Cortex fiel bei der Auswertung der Hirnschnitte auf, dass das C6-Gliom nicht immer wie geplant im Cortex gewachsen war. So zeigte sich bei einigen Tieren ein Tumorwachstum im Bereich des Ventrikels oder im Striatum. Diese Tiere wurden dennoch zur Untersuchung verwendet, da sich auch in diesen Tumoren invadierende Zellnester und ein Umgebungsödem darstellte. Für die Fragestellung der vorliegenden Untersuchung war die eigentliche Größe und Lokalisation des Tumors zudem nur von untergeordnetem Interesse, anders als bei einer Therapiestudie. Bei einer Therapiestudie hängt die Beurteilung der Wirkung einer Therapie auf das Wachstumsverhalten wesentlich von der reproduzierbaren Form und Größe der inokulierten Tumore ab. In der vorliegenden Studie wurde hingegen das Fluoreszenzverhalten im Tumor mit dem Fluoreszenzverhalten im Normal- bzw. ödematösen Gewebe verglichen. Diese Gewebssareale sind eindeutig und unabhängig von der Größe oder Form der Tumore identifizierbar. Wesentlich war auch nicht die Verteilung des Ödems, ein Faktor der ebenfalls von Größe und Form der Tumore abhing. Somit bestehen bei genauer Betrachtung der zugrunde liegenden Problematik aus unserer Sicht keine Bedenken gegen die Verwendung des C6-Gliommodells zur Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Untersuchung, trotz der sichtbaren Variationen in Größe und Form.

## 4.3 Diskussion der Ergebnisse

### 4.3.1 Dosisabhängigkeit von 5-Aminolävulinsäure

Nach systemischer Gabe von 5-ALA in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht bei Ratten mit C6 Gliomen konnte in den vorliegenden Experimenten eine Umwandlung zu fluoreszierendem Porphyrinen im Tumor nachgewiesen werden. Allerdings fand sich zwischen Tumorrand und Tumorzentrum ein Unterschied bzgl. der Fluoreszenzintensität. Der Tumorrand zeigte dabei eine weitaus stärkere Fluoreszenzakkumulation. Diese zunächst unerwartete Beobachtung könnte sich aus einer geringeren Verfügbarkeit von 5-ALA im Tumorzentrum und/oder einer verminderten Porphyrinsynthese aus 5-ALA im Tumorzentrum erklären lassen. Tatsächlich zeigen maligne Gliome im Zentrum deutliche Perfusionsdefizite, die durch Durchblutungsmessungen in malignen Gliomen nachgewiesen werden konnte (Eastwood et al. 2003, Fonchy et al. 2001, Toglia et al. 1996). Aufgrund des raschen Tumorwachstums hinkt die Gefäßversorgung nach, so dass die Nähr- und Sauerstoffversorgung der Tumorzellen insbesondere im Zentrum nicht ausreichend gewährleistet ist. Hieraus könnte sich eine verminderte Verfügbarkeit von 5-ALA im Tumorzentrum ergeben und dadurch bedingt die beobachtete, geringere Akkumulation von fluoreszierenden Porphyrinen.

Andererseits könnte die verminderte Nähr- und Sauerstoffversorgung zu einer Abnahme des Energiestoffwechsels in der Zelle und somit zu einer verringerten Umwandlung von 5-ALA zu PPIX im Tumorzentrum führen. Gegen diese Vermutung spricht allerdings die im Rahmen der vorliegenden Experimenten gemachten

Beobachtung nach i.v. Gabe von 5-ALA in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht. Bei diesen Experimenten fluoreszierte nicht nur der Tumorrand sondern gleichermaßen das Tumorzentrum. Offensichtlich spielt daher die Verfügbarkeit von 5-ALA im Tumorzentrum eine wesentlichere Rolle. Andererseits ließ sich durch die 5-fach höhere Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht keine vergleichbar hohe Zunahme der Fluoreszenz, d.h. des Porphyringehalts, im Randgebiet des Tumors erzielen. Dies spricht für eine Sättigung der Enzymsysteme in diesem Bereich. Diese Beobachtung ist bemerkenswert, da sie darauf hinweist, dass eine beliebige Erhöhung der 5-ALA Dosis nicht zwangsläufig mit einer gleichgearteten Zunahme der Fluoreszenz einhergeht.

Für die Methode der fluoreszenzgestützten Resektion maligner Gliome mit 5-ALA sollte von der vorwiegend randständigen Akkumulation von fluoreszierenden Porphyrinen kein wesentlicher Nachteil zu erwarten sein. Gerade der randständige Tumor ist für den Chirurgen unter Nutzung konventioneller Beleuchtung nur schwer zu erkennen.

#### **4.3.2 Unspezifische Fluoreszenz im ödematösen Hirngewebe**

Für die Methode der fluoreszenzgestützten Resektion maligner Gliome mit 5-ALA von besonderer Bedeutung ist die Spezifität der Markierung von Tumorgewebe durch 5-ALA induzierte Porphyrine. Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte bei hoher, systemischer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht eine signifikante Fluoreszenz auch im peritumoralen, ödematösen Gewebe ausgemacht werden. Weniger ausgeprägt war dieses Phänomen nach Gabe von 20 mg/kg Körpergewicht,

während die stärkste Fluoreszenz im peritumoralen, ödematösen Hirngewebe nach intratumoraler Gabe von 5-ALA zu beobachten war (Vgl. Abb. 11). Es ist unwahrscheinlich, dass diese Fluoreszenz die Folge einer spezifischen Verstoffwechslung von 5-ALA in vereinzelt Tumorzellnestern darstellt, die in der peritumoralen Ödemzone zu erwarten sind. Bei der interstitiellen Infusion von 5-ALA in normales Hirngewebe konnte ebenfalls eine signifikante Akkumulation fluoreszierender Porphyrine nachgewiesen werden (siehe unten), so dass davon ausgegangen werden muss, dass normales Hirngewebe in der Lage ist, Porphyrine aus 5-ALA zu synthetisieren. Insbesondere die letzte Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die unspezifische Porphyrinfluoreszenz nach Gabe von 100 mg/kg 5-ALA die Folge einer Verstoffwechslung von im Tumor extravasiertem 5-ALA darstellt, das sich mit dem Tumorödem durch sogenannten bulk flow (Reulen et al. 1973) in das umliegende Hirngewebe verteilt.

#### **4.3.3 Einfluss von Glukokortikoiden**

Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit Dexamethason in einer klinisch verwendeten Dosierung führte zur Verringerung der Fluoreszenzakkumulation im Tumorrand aber auch im Ödem. Diese Beobachtung unterstreicht klar die Abhängigkeit der Fluoreszenzakkumulation nach Gabe von 5-ALA von einer Störung der Blut-Hirn-Schranke im Tumorgewebe. Andererseits verhinderte die Dexamethasonvorbehandlung komplett die unspezifische Fluoreszenzmarkierung von peritumoralen, ödematösen Gewebe.

#### 4.3.4 5-Aminolävulinsäure-ester-derivate

Im Unterschied zur polaren Aminosäure 5-ALA sind 5-ALA-Ester durch die zusätzliche Kohlenwasserstoffkette und die Veresterung der Carboxylgruppe deutlich lipophiler. Es wäre also zu erwarten, dass sie leichter als 5-ALA die ungestörte Blut-Hirn-Schranke überwinden. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung kam es zur unerwarteten Akkumulation von Porphyrinfluoreszenz v.a. in den gesunden Faserbahnen des Gehirns und nicht im Tumor, insbesondere nach Gabe der langkettigen Ester. Diese Beobachtung zeigt, dass die Ester erwartungsgemäß die Blut-Hirn-Schranke passieren, offensichtlich in die Gliazellen gelangen und dort metabolisiert werden. Die Anhäufung der Fluoreszenz in der weißen Substanz nach Gabe der lipophilen 5-ALA-Ester erklärt sich vermutlich aus den vorwiegend in der weißen Substanz vorhandenen Lipide (vor allem Phosphatide, Cholesterin und Cerebroside; Bucher et al. 1989, Leonhardt et al. 1990). Allerdings sind zur Spaltung von Aminolävulinsäureestern in das für die Porphyrinsynthese notwendige, freie 5-ALA zusätzlich Esterasen nötig. Da Myelinscheiden im Gegensatz zu Axonen deutlich mehr Enzyme, darunter Esterasen, enthalten (Newman et al. 1995), kann in diesen Strukturen vermutlich auch vermehrt ALA-ester in 5-ALA umgewandelt werden. Der Intensitätsunterschied der Porphyrinfluoreszenz zwischen dem Methyl- und dem Hexylester behandelten Tieren lässt sich zwanglos aus der unterschiedliche Lipophilität beider Verbindungen erklären. Der Hexylester, der zu einer stärkeren Porphyrinfluoreszenz führte, ist durch einen aliphatischen Alkohol mit einer C<sub>6</sub> langen Carbohydratkette verestert. Dies bedingt eine deutlich höhere Lipophilität und somit einer vermutlich vermehrten Penetration im Vergleich zum Methylester, der nur eine C<sub>1</sub> lange Carbohydratkette besitzt (Gauillier et al. 1997).

Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits an nicht-ZNS Gewebe eine höhere und raschere 5-ALA-Aufnahme durch Gabe von 5-ALA-Ester nachweisen. Dabei akkumulierten die Ester deutlich schneller und stärker nach Veresterung mit Carbohydratketten ab einer Länge von C<sub>4</sub>. Die Umwandlung von Esterderivaten in PPIX erfolgt später in der Zelle über den Hämsyntheseweg, nach Spaltung des Esters durch Esterasen (Gaullier et al. 1997, Kloek et al. 1998, Peng et al. 1996, Peng et al. 1997, Washbrook et al. 1997).

#### **4.3.5 Interstitielle und intratumorale Applikation**

Bei der interstitiellen Infusion einer 1 mM, gepufferten 5-ALA-Lösung ins Normalgewebe konnte im Rahmen vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, dass eine signifikante Umsetzung von 5-ALA zu PPIX auch dann stattfindet, wenn keine Tumorzellen vorliegen. ZNS - Gewebe war also in der Lage, extrazelluläres 5-ALA aufzunehmen und in fluoreszierende Porphyrine umzuwandeln. Entscheidend für das Phänomen der Akkumulation scheint daher zu sein, dass 5-ALA die Blut-Hirn-Schranke überhaupt passiert. Bei der intratumoralen Infusion von 5-ALA zeigte sich, dass nicht nur das Tumorgewebe fluoreszierte, sondern auch das umliegende Gewebe, dort wo keine Tumorzellen zu erwarten waren. Hier war die Fluoreszenz entsprechend unspezifisch. Wie während der Experimente mit der interstitiellen Infusion von 5-ALA bereits beobachtet, muss davon ausgegangen werden, dass 5-ALA sich mit der Perfusionsflüssigkeit aus dem Tumor herausbewegt um im umliegenden Gewebe aufgenommen und zu fluoreszierenden Porphyrinen metabolisiert zu werden.

#### **4.4 Integration der Ergebnisse in ein Gesamtmodell - Analyse in Hinblick auf die Anwendung von 5-Aminolävulinsäure bei ZNS-Tumoren des Menschen**

Die Versuche zeigen, dass die weiße Substanz des ZNS prinzipiell in der Lage ist, 5-ALA zu fluoreszierenden Porphyrinen umzuwandeln. Voraussetzung ist, dass 5-ALA entweder durch Veresterung zu einer lipophilen Verbindung umgewandelt wird und somit in die Lage versetzt wird, die BHS zu passieren, oder aber, dass 5-ALA unter Umgehung der BHS direkt das Interstitium erreicht. Der letztere Mechanismus ließ sich bei den Experimenten mit interstitiellen Infusion von 5-ALA-haltigen Lösungen entweder von Tumor- oder Normalgewebe nachweisen. Die intravenöse Gabe von exzessiven 5-ALA-Mengen (100mg/kg) führte ebenfalls zum Nachweis von Porphyrinfluoreszenz im perifokalen Ödem. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Beobachtung ist eine Mitbewegung von 5-ALA mit dem perifokalen Ödem. Andererseits bewirkte eine Vorbehandlung mit Kortikosteroiden eine Verringerung der Porphyrinsynthese im Tumor und verhinderte gleichzeitig eine unspezifische Gewebemarkierung im perifokalen Ödem. Beide Beobachtungen stehen im Einklang mit der erwarteten Verringerung der Permeabilität der gestörten Blut-Hirn-Schranke durch die Vorbehandlung.

Die exzessive Gabe von 5-ALA in einer Dosis die 5-fach höher lag als bisher erfolgreich beim Menschen eingesetzt (Stummer et al. 2000) führte hingegen nicht zu einer gleichartigen Vermehrung der Porphyrinfluoreszenz, was auf eine Sättigung der Porphyrinsynthesemechanismen in den Tumorzellen hinweist.

Was bedeuten die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung in Hinblick auf die Anwendung der fluoreszenzgestützte Resektion maligner Gliome mit 5-ALA beim Menschen?

Zunächst ist festzustellen, dass sich Ester von 5-ALA prinzipiell hierzu *nicht* eignen. Methoden der intratumoralen Injektion werden ebenfalls keinen Vorteil erwarten lassen, da die Gefahr einer unspezifischen Gewebemarkierung besteht. Auch ist von einer erhöhten Dosis von 5-ALA kein klarer Vorteil zu erwarten. Im Gegenteil: Es besteht die Gefahr einer unspezifischen und ungewollten Markierung des umliegenden, ödematösen Hirngewebes. Glukokortikoide, die für die moderne Neurochirurgie maligner Gliome unerlässlich sind, führen zwar zu einer geringgradigen Verringerung der Tumorfluoreszenz, verhindern aber eine unspezifische, perifokale Gewebsfluoreszenz – eine überaus erwünschte Wirkung

Die vorliegenden Untersuchungen lassen allerdings das potentielle Risiko einer ungewollten, unspezifischen Fluoreszenzmarkierung des perifokalen, ödematösen Hirngewebes erkennen. Bei der klinisch bislang verwendeten Dosis von 20 mg/kg 5-ALA Körpergewicht bei mit Glukokortikoid vorbehandelten Patienten scheint sich dieses Risiko bislang jedoch nicht zu bestätigen. Bei über 300 Proben aus dem Übergangsbereich zwischen fluoreszierenden und angrenzenden, nicht-fluoreszierenden Gewebe konnte bei 50 operierten Patienten mit malignen Gliomen nur eine einzige, scheinbar falsch-fluoreszenzpositive Gewebprobe ohne sicheren Tumornachweis ausgemacht werden (Stummer et al. 2000). Auch in einer jetzt kurz vor dem Abschluss stehenden, multizentrischen, randomisierten Zulassungsstudie für 5-ALA konnte bei über 200 mit 5-ALA operierten Patienten keine einzige falsch

fluoreszenzpositive Probe aus dem Tumorrandbereich gefunden werden (Stummer et al. 2004, zur Veröffentlichung eingereicht).

Während die jetzigen Experimente eine zentrale Bedeutung der gestörten Blut-Hirn-Schranke für die Synthese von 5-ALA-induzierten Porphyrinen belegen, zeigen Untersuchungen an Proben von menschlichen, malignen Gliomen, dass beim Menschen die im Tumorgewebe gestörte Blut-Hirn-Schranke nur ein *Teilaspekt* darstellt. Unabhängig von dem Grad der Gefäßproliferation und damit vom Grad der Störung der Blut-Hirn-Schranke im Tumorgewebe war die Fluoreszenzintensität signifikant auch von der Tumorzell-dichte und insbesondere von der Proliferationsrate des Tumorgewebes abhängig (Novotny et al. 2000). Der gestörten Blut-Hirn-Schranke kommt also im Rahmen der Fluoreszenzakkumulation eine *permissive* Rolle zu, während beim malignen Gliom des Menschen andere, tumorabhängige, Faktoren eine stärkere Bedeutung zukommt.

## 5 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die Fluoreszenzgestützte Resektion mit 5-ALA wird bereits seit Jahren erfolgreich in der Therapie von malignen Gliomen eingesetzt. Die Ursache für die selektive Porphyrin IX-Akkumulation in den Tumorzellen konnte bislang nicht geklärt werden. Es wird bereits seit längerem diskutiert, dass die im malignen Gliom gestörte Blut-Hirn-Schranke Einfluß auf dieses Phänomen hat. Ziel dieser Arbeit war die Rolle der Blut –Hirn-Schranke näher zu charakterisieren.

**Methoden:** Es wurden männlichen Wistar-Ratten jeweils  $10^6$  C6-Gliomzellen stereotaktisch in den Cortex inokuliert. 9 Tage nach Implantation, nachdem ein Tumor mit ausreichender Größe gewachsen war, wurden einer Versuchsgruppe (n = 6) die klinisch übliche Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht 5-ALA, einer zweiten Gruppe (n = 6) eine gesteigerte Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht 5-ALA intravenös verabreicht. Zwei weiteren Gruppen (n = 6) wurde jeweils die lipophilen Derivate 5-ALA-Methylester oder 5-ALA-hexylester intravenös verabreicht. Eine weitere Gruppe (n = 6) erhielt stereotaktisch eine intratumorale Instillation einer 1mMol 5-ALA-Lösung. Zur Kontrolle erhielt eine Versuchstiergruppe (n = 6), die keinen Tumor besaß, eine interstitielle Infusion einer 1mMol 5-ALA-Lösung.

Aus den entfernten Gehirnen wurden Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden mikroskopisch, sowie spektroskopisch auf Porphyrin IX-Fluoreszenz untersucht.

**Ergebnisse:** Bei der systemischen Applikation von 5-ALA in der Dosierung 20 mg/kg fluoreszierte hauptsächlich der randständige Teil des Tumors. Die Fluoreszenzausbeute war im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen am niedrigsten. Bei der systemischen Applikation von 5-ALA in der Dosierung 100 mg/kg fluoreszierte der gesamte Tumor. Die Fluoreszenzintensität war hier am größten. Zusätzlich zeigte sich eine Fluoreszenz des perifokalen Ödems. Bei der Applikation

der lipophilen Esterderivaten zeigte sich eine Fluoreszenz der Nervenbahnen. Der Tumor zeigte keine signifikante Fluoreszenzakkumulation. Bei der intratumoralen Applikation von 5-ALA zeigte sich eine unspezifische Fluoreszenzverteilung. Auch das umliegende Gewebe fluoreszierte. In der Kontrollgruppe ohne Tumor zeigte sich eine Fluoreszenz des Normalgewebes.

**Schlussfolgerung:** Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass ZNS-Gewebe und nicht nur Gliomgewebe in der Lage ist, 5-ALA in fluoreszierende Porphyrine umzuwandeln. Dabei kommt der im Tumor gestörten Blut-Hirn-Schranke eine entscheidende Rolle, indem sie 5-ALA passieren läßt. Vorteile durch Verwendung veresterter und damit lipophilere 5-ALA-Derivate oder einer Erhöhung der 5-ALA Dosis in Hinblick auf die spezifische Fluoreszenzausbeute im Tumorgewebe ließen sich nicht nachweisen. Im Gegenteil: Es kam zur unspezifischen Fluoreszenzmarkierung der weißen Bahnen durch die Ester bzw. der perifokalen Ödemzone durch die erhöhte Dosis. Die bislang klinisch verwendete Dosis von 20 mg/kg in Verbindung mit Steroidvorbehandlung schien am geeignetsten, die gewünschte, spezifische Tumorfluoreszenz zu vermitteln.

## 6 Literatur

Ackermann G, Abels C, Bäuml W, Langer S, Landthaler M, Lang EW, Szeimies RM: Simulations on the selectivity of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in vivo. *J Photochem Photobiol B* 47:121-128, 1998

Albert FK, Forsting M, Sartor K, Adams HP, Kunze S: Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurgery* 34:45-60, 1994

Ammirati M, Vick N, Liao Y, Ciric I, Mikhael M: Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas. *Neurosurgery* 21:201-206, 1987

Auer RN, Del Maestro RF, Anderson R: A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Can J Neurol Sci* 8: 325 – 331, 1981

Barker FG III, Prados MD, Chang SM, Gutin PH, Lamborn KR, Larson DA, Malec MK, McDermott MW, Sneed PK, Wara WM, Wilson CB: Radiation response and survival time in patients with glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 84:442-448, 1996

Becker DM, Cayanis E, Kramer S: The effect of Delta-Aminolevulinic Acid on the Synthesis and Metabolism of GABA in Rabbit Brain Homogenates. *S Afr Med J*, 57(12):458-460, 1980

Berne RM, Levy MN: Physiology, 3. Edition, Mosby Year Book, St. Louis, Baltimore, Boston, 1993

Bertram s, Bonitz D, Gassen G, Papandrikopoulou A, Weber M, Weiler H, Wollny E: Die Blut-Hirn-Schranke – eine Organ-Barriere. Kontakte (Darmstadt) 1, 17, 1988

Betz E, Reutter K, Mecke D, Ritter H: Biologie des Menschen, 15. Auflage, Quelle & Meyer Verlag, Wiebelsheim 2001

Blasberg RG, Gazendam J, Patlak CS, Fenstermacher JD: Quantitative autoradiographic studies of brain edema and a comparison of multiisotope autoradiographic techniques. Adv. Neurol. 28:255-270, 1980

Breyer R, Hussein S, Radu DL, Putz KM, Gunia S, Hecker H, Samii M, Walter GF, Stan AC: Disruption of intracerebral progression of C6 rat glioblastoma by in vivo treatment with anti-CD44 monoclonal antibody. J Neurosurg 92: 140 – 149, 2000

Bucher O, Wartenberg H: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 11.Auflage, Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Toronto, 227, 1989

Cheeks C, Wedeen RP: Renal Tubular Transport of Delta-Aminolevulinic Acid in Rat. Proc Soc. Exp. Biol. Med. 181(4):596-601, 1986

Criscuolo FR, Lelkes PI, Rotrosen D, Oldfield EH: Cytosolic calcium changes in endothelial cells induced by a protein product of human gliomas containing vascular permeability factor activity. J. Neurosurg. 71:884-891, 1989

Dailey HA, Smith A: Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochem. J.* 223/2:441-445, 1984

Del C Battle AM: Porphyrins, porphyries, cancer and photodynamic therapy – a model of carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 20:5-20, 1993

Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ: Resection, biopsy and survival in malignant glial neoplasms. A retrospective study of clinical parameters, therapy and outcome. *J Neurosurg* 78:767-775, 1993

Doring F, Walter J, Will J, Focking M, Boll M, Amasheh S, Clauss W, Daniel H: Delta-Aminolevulinic Acid Transport by Intestinal and Renal Peptide Transporters and its Physiological and Clinical Implications. *J Clin. Invest.* 101(12):2761-2767, 1998

Eastwood JD, Provenzale JM: Cerebral blood flow, blood volume, and vascular permeability of cerebral glioma assessed with dynamic CT perfusion imaging. *Neuroradiology* 45:373-376, 2003

Eisenberg HM, Barlow CF, Lorenzo AB: Effect of dexamethasone on altered brain vascular permeability. *Arch. Neurol.* 23, 18-22, 1970

El-Sharabasy MM, El-Waseef AM, Hafez MM, Salim SA: Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br J Cancer* 65/3:409-412, 1992

Ennis SR, Novotny A, Xiang J, Shakui P, Masada T, Stummer W, Smith DE, Keep RF: Transport of 5-Aminolevulinic Acid between Blood and Brain. *Brain Res.* 959(2):226-234, 2003

Farrell CL, Stewart PA, Del Maestro RF: A new glioma model in rat: the C6 spheroid implantation technique permeability and vascular characterization. *J Neurooncol* 4: 403 – 415, 1987

Fonchy E, Lahrech H, Francois-Joubert A, Dupeyre R, Benderbous S, Corot C, Farion R, Rubin C, Decorps M, Remy C: A new Gadolinium-based contrast agent for magnetic resonance imaging of brain tumors: kinetic study on a C6 rat glioma model. *Journal of magnetic resonance imaging* 14:97-105, 2001

Fritsch C, Becker-Wegerich PM, Schulte KW, Lehmann P, Ruzicka T, Goerz G: Treatment of a large superficial basal cell carcinoma of the breast. Combination of photodynamic therapy and surgery controlled by photodynamic diagnosis. *Hautarzt* 47:438-444, 1996

Gade GF, Becker DP, Miller JD: Pathology and pathophysiology of head injury, In: Youmans J (eds), *Neurological surgery*. Philadelphia, W.B. Saunders, 196-216, 1990

Gaullier JM, Berg K, Peng Q, Anholt H, Selbo PK, Ma LW, Moan J: Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer Res* 57:1481-1486, 1997

Go KG, Gazendam J, Van Zanten: Influence of hypoxia on the composition of isolated edema fluid in cold-induced brain edema. *J. Neurosurg.* 51:78-84, 1979

Goetz C, Reulen H-J: Status und Perspektiven der Therapie maligner Gliome. *Praktische Onkologie IX, Aktuelle Onkologie.* Zuckschwerdt-Verlag, München. 106:14-25, 1999

Goldbrunner R, Bendszus M, Tonn JC: Models for Angiogenesis in Gliomas. *Cancer Treat Res.* 117:115-35. Review, 2004

Grant WE, Hopper C, MacRobert AJ, Speight M, Brown SG: Photodynamic therapy of oral cancer: photosensitization with systemic aminolevulinic acid. *Lancet* 342:147-148, 1993

Grobben B, De Deyn PP, Slegers H: Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 310: 257 – 270, 2002

Inuma S, Farshi SS, Ortel B, Hasan T: A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br J Cancer* 70:21-28, 1994

Kabuto M, Kabuto T, Kobayashi H, Nakagawa T, Ishii H, Takeuchi H, Kitai R, Kodera T: Experimental and clinical study of glioma surgery using fluorescent imaging by a surgical microscope after fluorescein administration. *Neurol Res* 19:9-16, 1997

Keep RF: The blood-brain barrier. In: Walz W: The Neuronal Environment: Brain Homeostasis in Health and Disease. Totowa: Humana Press Inc. 277-307, 2001

Keles GE, Anderson B, Berger MS: The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere. Surg Neurol 52:371-379, 1999

Kelly PJ, Rappaport ZH, Bhagwati SN, Ushio Y, Vapalahti M, de Tribolet N: Reoperation for recurrent malignant gliomas: what are your indications? Surg Neurol 47:39-42, 1987

Kennedy JC, Pottier RH: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol 14:275-292, 1992

Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC: Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. J Photochem Photobiol B 6:143-148, 1990

Klatzo I, Piraux A, Laskowski EJ: The relationship between edema, blood-brain barrier and tissue elements in a local brain injury. J Neuropathol. Exp. Neurol. 17:548-564, 1958

Klatzo I: Neuropathological aspects of brain edema. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 26: 1-4, 1967

Kloek J, Akkermans W, Beijersbergen van Henegouwen GMJ: Derivates of 5-Aminolevulinic Acid for Photodynamic Therapy: enzymatic Conversion into Protoporphyrin. *Photochem. Photobiol.* 67(1): 150-154, 1998

Kowalczyk A, MacDonald RL, Amidei C, Dohrmann III F, Erickson RK, Hekmatpanah J, Krauss S, Krishnasamy S, Masters G, Mullan SF, Mundt AJ, Sweeney P, Vokes EE, Weir BKA, Wollmann RL: Quantitative imaging study of extent of surgical resection and prognosis of malignant astrocytomas. *Neurosurgery* 41:1028-1038, 1997

Kriegmair M, Baumgartner R, Knüchel R, Stepp H, Hofstädter F, Hofstetter A: Detection of early bladder cancer by 5-aminolaevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *J Urol* 155:105-109, 1996

Lee Y, Bullard DE, Humphrey PA, Colapinto EV, Friedman HS, Zalutsky MR, Coleman RE, Bigner DD: Treatment of intracranial human glioma xenografts with <sup>131</sup>I-labeled anti-tenascin monoclonal antibody 81C6. *Cancer Res* 48: 2904 – 2910, 1988

Leonhardt H: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, 8. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 243-244, 1990

Loh CS, MacRobert AJ, Bedwell J, Regula J, Krasner N, Bown SG: Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *Br J Cancer* 68:41-51, 1993a

Loh CS, Vernon DI, MacRobert AJ, Bedwell J, Brown SG, Brown SB: Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolaevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract. *J Photochem Photobiol B* 20:47-54, 1993b

Long DM: Traumatic brain edema. *Clin. Neurosurg.* 29:174-202, 1982

Love JA, Friden H, Ekstedt H: Effect of corticosteroids at the Level of the arachnoid villi. In: K.G. Go und A. Baethmann (eds): *Recent progress in the study and therapy of brain edema.* New York, Plenum Press, 589-595, 1984

Maron A, Gustin T, Le Roux A, Mottet I, Dedieu JF, Brion JP, Demeure R, Perricaudet M, Octave JN: Gene therapy of rat C6 glioma using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene: long-term follow-up by magnetic resonance imaging. *Gene Ther* 3: 315 – 322, 1996

Mayman CI: Inhibitory effect of dexamethasone on sodium-potassium activated adenosine triphosphatase of choroids plexus in cat and rabbit. *Fed. Proc.* 31:591, 1972

McLoughlin JL, Cantrill RC: The Effect of Delta-Aminolevulinic Acid on the High Affinity Uptake of Aspartic Acid by Rat Brain Synaptosomes. *Gen. Pharmacol.* 15(6):553-555, 1984

Moore GE, Peyton WT, Frencgh LA, Walker WW: The clinical use of fluorescein in neurosurgery. The localization in brain tumors. *J Neurosurg* 5:392-398, 1948

Nagano N, Sasaki H, Aoyagi M, Hirakawa K: Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 86: 117 – 125, 1993

Newman S, Saito M, Yu RK: Biochemistry of myelin proteins and enzymes. In *Neuroglia*, Oxford University Press 535-554, 1995

Nitta T, Sato K: Prognostic implications of the extent of surgical resection in patients with intracranial malignant gliomas. *Cancer* 75:2727-2731, 1995

Pappius HM, Wolfe L: Effect of drugs on local cerebral glucose utilization in traumatized brain; mechanisms of action of steroids revisited. In: K.G. Go und A. Baethmann (eds): *Recent progress in the study and therapy of brain edema*. New York, Plenum Press, 11-26, 1984

Peng Q, Moan J, Warloe T, Iani V, Steen HB, Bjørseth A, Nesland JM. Build-up esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 34:95-96, 1996

Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM: 5-Aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy: Principles and experimental research. *Photochem Photobiol* 65:235-251, 1997

Pilkington, G. J. and Lantos, P. L.: Pathology of experimental brain tumors., in: Thomas, D. G. (eds.): *Neurooncology, primary malignant brain tumors*. Edward Arnold, 51 – 76, 1990

Poon WS, Schomaker KT, Deutsch TF, Martuza RL: Laser-induced fluorescence: experimental delineation of tumor resection margins. *J Neurosurg* 76:679-686, 1992

Regula J, MacRobert AJ, Gorchein A, Buonaccorsi GA, Thorpe SM, Spencer GM, Hatfield AR, Brown SG: Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal and colorectal tumours using 5-aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX – a pilot study. *Gut* 36:67-75, 1995

Reulen HJ, Kreysch HG: Measurement of brain tissue pressure in cold induced cerebral oedema. *Acta Neurochir (Wien)*. 1973;29(1):29-40.

Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1047-1048, 1995

Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1075-1078, 1995

Rostomily RC, Spence AM, Duong D, McCormick K, Bland M, Berger MS: Multimodality management of recurrent adult malignant glioma: results of a phase II multiagent chemotherapy study and analysis of cytoreductive surgery. *Neurosurgery* 35:378-388, 1994

Samdani AF, Tamargo RJ, Long DM: Brain tumor edema and the role of the blood-brain barrier. *Handbook of Clinical Neurology* 23:71-102, 1997

San Galli F, Vrignaud P, Robert J, Coindre JM, Cohadon F: Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. *J Neurooncol* 7: 299 – 304, 1989

Schmidt RF, Thews G: *Physiologie des Menschen*, 24. Edition, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1990

Schoenfeld N, Mamet R, Epstein O, Lahav M, Lurie Y, Atsmon A: The heme biosynthetic pathway in the regenerating rat liver. The relation between enzymes of heme synthesis and growth. *Eur J Biochem* 166:663-666, 1987

Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fishbach J, Isaacson S, Rotam M, Asbell SO, Nelson JS, Weinstein AS, Nelson DF: Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26:239-249, 1993

Stummer W, Goetz C, Hassan A, Heimann DVM, Kempfski O: Kinetics of photofrin II in perifocal brain edema. *Neurosurgery* 33:1075-1082, 1993

Stummer W, Stocker S, Novotny A, Heimann A, Sauer O, Kempfski O, Plesnila N, Wietsorrek J, Reulen HJ: In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolaevulinic acid. *J Photochem Photobiol B* 45:160-169, 1998a

Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, Goetz C, Goetz AE, Kiefmann R, Reulen HJ: Intraoperative Detection of Malignant Gliomas by 5-Aminolaevulinic Acid-induced Porphyrin Fluorescence. *Neurosurgery* 42:518-526, 1998

Tewes B, Franke H, Hoheisel D, Hellwig S, Decker S, Griesche D, Tilling T, Wegener J, Galla HJ: Preparation of endothelial cells in primary cultures obtained from 6-months old pigs. In: Boer AG, Sutanto W (eds): *Drug transport across the blood-brain barrier: in vitro and in-vivo techniques*. Harwood Academic Publishers, 91-97, 1997

Toglia A, Kittelson JM, Roemer RB, Hodak JA, Carter LP: Cerebral bloodflow in and around spontaneous malignant gliomas. *Int J Hyperthermia* 12(4):461-476, 1996

Van Hillegersberg R, van den Berg JW, Wort WJ, Terpstra OT, Wilson JH: Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats. *Gastroenterology* 103:645-651, 1992

Vecht CJ, Avezaat CJJ, Putten WLJ, Eickenboom WMH, Stefanko SZ: The influence of the extent of surgery on the neurological function and survival in malignant glioma. A retrospective analysis in 243 patients. *J Neurol Neurosurg Psych* 53:466-471, 1990

Washbrook R, Riley PA : Comparison of  $\delta$ -aminolevulinic acid and its methyl ester as an inducer of porphyrin synthesis in cultured cells. *Brit. J. Can.* 75(10):1417-1420, 1997

Whittle IR, Macarthur DC, Malcolm GP, Li M, Washington K, Ironside JW: Can experimental models of rodent implantation glioma be improved? A study of pure and mixed glioma cell line tumours. *J Neurooncol* 36: 231 – 242, 1998

Winger MJ, MacDonald DR, Cairncross JG: Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma. *J Neurosurg* 71:487-493, 1989

Wisoff JH, Boyett JM, Berger MS, Brant C, Li H, Yates AJ, McGuire-Cullen P, Turski PA, Sutton LN, Allen JC, Packer RJ, Finlay JL: Current management and the impact of the extent of resection in the treatment of malignant gliomas of childhood: a report of the Children's cancer group trial No. CCG-945. *J Neurosurg* 89:52-59, 1998

Wood RJ, Green SB, Shapiro WR: The prognostic importance of tumor size in malignant gliomas: A computed tomographic scan study by the brain tumor cooperative Group. *J Clin Oncol* 6:338-343, 1988

Yoshida J, Kajita Y, Wakabayashi T, Sugita K: Long-term follow-up results of 175 patients with malignant glioma: importance of radical tumour resection and postoperative adjuvant therapy with interferon, ACNU and radiation. *Acta Neurochir* 127:55-9, 1994

## 7 Danksagung

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente wurden im Laser-Forschungslabor der Urologischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Alfons Hofstetter) durchgeführt.

Nach Abschluß dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Reulen, dem ehemaligen Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, und Prof. Dr. Jörg-Christian Tonn, dem jetzigen Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, für die freundlich-familiäre Aufnahme in ihrer Klinik.

Herrn PD Dr. Walter Stummer für die Überlassung des interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung. Seine jederzeit gewährte Unterstützung und der rege Erfahrungsaustausch haben die vorliegende Arbeit entscheidend geprägt.

Frau Dr. Susanne Stocker, Herrn Dr. Reinhold Baumgartner, Herrn Dr. Herbert Stepp und Herrn Dipl. Ing. Thomas Pongratz, die diese Arbeit von der Seite des Laser-Forschungslabors betreuten, für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ohne diese die vorliegende Arbeit kaum möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. Alexander Novotny und Dr. Bernhard Olzowy, meinen Mitdoktoranden, für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei den Experimenten.

Herrn Dr. Karl Bise für die histopathologische Beurteilung der Präparate.

Frau Dr. Claudia Goetz für die berufliche und wissenschaftliche Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums und insbesondere in der Zeit, die für die Erstellung der vorliegenden Arbeit notwendig war, jederzeit bedingungslos unterstützt hat. Ohne ihre Hilfe wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit durchzuführen.

## 8 Lebenslauf

### Walter Rachinger

Geburtsdatum: 16. Dezember 1972

Geburtsort: Pappenheim

Eltern: Marie Rachinger, geb. Lotter  
Walter Rachinger sen.

Familienstand: ledig

#### Ausbildung und beruflicher Werdegang:

1979 – 1983: Grundschule Pappenheim

1983 – 1992: Werner-von-Siemens Gymnasium, Weißenburg

1992 – 1993: Wehrdienst

1994 – 2001: Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München

August 2001 – Januar 2003: Arzt im Praktikum an der Neurochirurgischen Klinik, Klinikum Großhadern in München  
(Direktor: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn)

seit Februar 2003: Assistent an der Neurochirurgischen Klinik, Klinikum Großhadern in München  
(Direktor: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn)